

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2013

Duyen Le

# hARO-LUC -HIIRIMALLI

– lusiferaasiaktiivisuuden mittaaminen hiiren  
kudoksista



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Duyen Le

## hARO-LUC -HIIRIMALLI

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella ja se oli osa laajempaa Fubio-projektia. Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata uutta Turun yliopistossa tuotettua ihmisen aromataasigeenin koko säätelyaluetta ilmentävää hiirimallia ja tutkia, kuinka hyvin aromataasigeenin säätely hiirimallissa kuvastaa aromataasin säätelyä naisilla, etenkin rasvakudoksissa.

Työssä käytettiin FVB/N -hiirikantaan tuotettua hARO-Luc -siirtogeenihiirimallia, joka ilmentää ihmisen aromataasigeenin koko eksoni 1 -promootorialueita (eksonit 1-10) yhdistettynä lusiferaasireportterigeeniin. Siinä haluttiin tutkia, miten hyvin tuotettu hiirimalli kuvastaa tilannetta ihmisessä. Tutkimuksessa käytettiin kahta hiirityyppiä OVX ja SHAM. OVX-hiirille on tehty toimenpide, jossa niiden munasarjat on poistettu ja SHAM-hiireille on tehty sama toimenpide ilman itse koetoimenpidettä, jotta molemmat hiirityypit kokevat saman stressin. SHAM -hiiret edustavat premenopausaalista tilannetta ja OVX-hiiret postmenopausaalista tilannetta. Työssä määritettiin näytteiden lusiferaasiaktiivisuus, joka suhteutettiin näytteiden proteiiniipitoisuuteen.

Jatkotutkimuksessa haluttiin tutkia, vaikuttaako plasebopelletin lisäysoperaatio reportterin lusiferaasi-ilmentymiseen maitorauhasessa ja onko eri maitorauhasten välillä eroja. Plasebo on näennäislääke eli aine, jolla ei ole aineellista vaikutustapaa, mutta se toimii lääkkeen tavoin, koska tutkittava kohde uskoo sen lääkkeeksi. Lisäksi haluttiin tutkia, vaikuttaako hiirten ikä reportterin ilmentymiseen rasvakudoksessa.

Tuloksissa ainoa rasvakudos, jolla oli merkittäviä eroja hiirten välillä, oli maitorauhanen. Muissa kudoksissa ei ollut merkittäviä eroja. Jatkotutkimuksessa osoitettiin, että pelkkä pelletin lisäysoperaatio nostaa maitorauhasen lusiferaasin ilmentymistä huomasti, joten tämä menetelmä ei sellaisenaan sovellu maitorauhasessa paikallisesti aromataasia säätelevien tekijöiden tutkimiseen. Myöskään eri-ikäisten hiirten ja eri maitorauhasten välillä ei ollut merkittäviä eroja.

ASIASANAT: aromataasi, estrogeeni, FVB/N, lusiferaasi, maitorauhanen, postmenopausaalinen, premenopausaalinen, rasvakudos, rintasyöpä, siirtogeeninen

Duyen Le

## hARO-LUC MOUSE MODEL

This thesis was conducted at the Institute of Biomedicine of Turku University as part of the Fubio project. The purpose of this thesis was to investigate how well the mouse model expressing the human aromatase gene promoter reflects the examined situation in humans, especially in different adipose tissues.

In this study FVB/N based transgenic mice, hARO-Luc were used, which express the full-length human aromatase gene promoter region connected to the luciferase reporter. Two types of mice were used, SHAM and OVX. The SHAM mice had undergone same operation as the OVX without removal of ovaries so that they would experience the same stress. The SHAM mice represented the situation in premenopausal women while OVX mice represented the postmenopausal situation. A luciferase Assay Kit was used for measuring the luciferase activity and a BCA2 Assay Kit was used for determining the protein, by which the luciferase activities in different size of tissues were balanced.

A further purpose of the study was to determine how the placebo pellet insertion procedure affects the luciferase expression of the reporter and whether there are differences between different mammary glands. The placebo pellet is a simulated or otherwise medically ineffectual solution that works as a medicine because the target believes it as a drug. The study also set out to determine whether the age of mice affects the luciferase expression in adipose tissues.

In the results of the study, the only adipose tissue that showed differences between SHAM and OVX mice was mammary gland. There were no statistical differences in any other tissues. Further investigation showed that the insertion of pellet increases the luciferase expression significantly. Consequently this method was not suitable for investigating the effects of PGE<sub>2</sub>, it being known that the PGE<sub>2</sub> affects the aromatase expression in mammary glands. Neither were there significant differences between mice of different ages or between different mammary glands.

**KEYWORDS:** adipose tissue, aromatase, breast cancer, estrogen, FVB/N, mammary gland, luciferase, postmenopausal, premenopausal, transgenic

# SISÄLTÖ

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ESTROGEENIT JA RINTASYÖPÄRISKI</b>	<b>3</b>
2.1	Aromataasi ja estrogeeni	3
2.2	Lihavuus ja rintasyöpäriski	5
<b>3</b>	<b>IHMISEN JA HIIREN MAITORAUHASET</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>GEENIMUUNNELUT ELÄIMET</b>	<b>9</b>
4.1	Siirtogeeniset hiiret	9
4.2	Koe-eläintoiminta ja siihen liittyvät eettiset kysymykset	10
4.3	hARO-LUC -hiirimalli	13
<b>5</b>	<b>MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>15</b>
5.1	Lusiferaasimittaus	15
5.2	Proteiinimittaus	15
<b>6</b>	<b>TYÖN SUORITUS</b>	<b>17</b>
6.1	Esivalmistelu	17
6.2	Näytteiden keruu	17
6.3	Homogenointi ja sentrifugointi	19
6.4	Lusiferaasimittaus	20
6.5	Proteiinimittaus	21
<b>7</b>	<b>JATKOTUTKIMUS</b>	<b>23</b>
<b>8</b>	<b>TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>24</b>
8.1	Jatkotutkimuksen tulokset	28
<b>9</b>	<b>VIRHETARKASTELU</b>	<b>30</b>
<b>10</b>	<b>JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUKSEN POHDINTA</b>	<b>31</b>
	<b>LÄHTEET</b>	<b>33</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Esimerkkilasku maitorauhaselle
- Liite 2. Lusiferaasi- ja proteiinimittausten tulokset
- Liite 3. Lusiferaasinmittaus (työohje)
- Liite 4. Proteiinin mittaus (työohje)
- Liite 5. Standardiliuosten proteiinimäärityksen tulokset
- Liite 6. Lusiferaasimittauksen ohjelma
- Liite 7. Proteiinimittauksen ohjelma
- Liite 8. Reagenssit
- Liite 9. Liuosten valmistusohje

## KUVAT

- Kuva 1. Estradiolin muodostuminen testosteronista aromataasientsyymin avulla. (15) 5
- Kuva 2. Estrogeenien tuottaminen androgeeneistä aromataasin avulla. (17) 6
- Kuva 3. Hiiren maitorauhanen ja imusolmuke. (21) 7
- Kuva 4. Kuvassa on hiiren viisi rauhasparia. L tarkoittaa vasenta puolta ja R oikeanpuoleista. (23, 24) 7
- Kuva 5. Ihmisen rinnan poikkileikkaus, josta näkyy maitorauhasen erilliset lohkot. (21) 8
- Kuva 6. Siirtogeenisen hiiren tuoton tapahtumasarja mikroinjektiolla. (33) 10
- Kuva 7. Koe-eläintoiminnan kaavio. 11
- Kuva 8. Hiirten korvamerkinnät. (40) 12
- Kuva 9. Hiiren tainnutus hiilidioksidilla. 12
- Kuva 10. hARO-Luc -hiirimalli, joka ilmentää ihmisen aromataasigeenin koko eksoni 1 -aluetta yhdistettynä lusiferaasireportterigeeniin. (3) 14
- Kuva 11. Esimerkkikuva koe-eläintyöskentelystä. 18
- Kuva 12. Hiirten henkilökortti, josta näkee niiden syntymäajat, DNA-koodit, vanhemmat, kannan, korvanumerot ja kappalemäärän. 18
- Kuva 13. Tutkimushiiren preparoiminen. 19
- Kuva 14. Näytteen homogenointi Ultra-turraxilla. 20
- Kuva 15. Näytteet ovat pipetoituina kuoppalevyyn lusiferaasimittauksia varten. Tarrasuoja on laitettu levyn päälle kuljettamisen ajaksi. 21
- Kuva 16. Inkuboitu kuoppalevy, jossa on tapahtunut värinmuutosreaktio. 22

## KUVIOT

- Kuvio 1. SHAM- ja OVX hiirten lusiferaasi-ilmentymät maitorauhaselle, pernalle, paksusuolelle, virtsarakolle ja kohdulle. 26
- Kuvio 2. SHAM- ja OVX hiirten lusiferaasi-ilmentymät eri rasvoissa (gonadaalinen rasva, suoliliepeen rasva, retroperitoneaalinen rasva ja ruskea rasva) sekä reisiluussa ja emättimessä 27
- Kuvio 3. SHAM- ja OVX hiirten lusiferaasi-ilmentymät munasarjoille ja aivoille. Munasarjoissa ei ole OVX-hiirille tuloksia. 28
- Kuvio 4. Plasebopelletoitujen ja käsittelemättömien hiirten lusiferaasiaktiivisuus maitorauhasessa (numero 4). Toisessa pellettiä on pidetty yksi päivä ja toisessa kuusi päivää. 28
- Kuvio 5. Eri-ikäisten (6 kk, 5 kk, 4 kk) hiirten maitorauhasen lusiferaasiaktiivisuudet. Toisessa on maitorauhanen numero 2 ja toisessa numero 4. Molemmat ovat oikeanpuoleisia. Kuviossa myös gonadaalisen ja retroperitoneaalisen rasvan lusiferaasiaktiivisuudet. 29

## TERMIT JA LYHENTEET

BAC	bacterial artificial chromosome, keinotekoinen bakteerikromosomi
BCA	bicinchoninic acid assay, kolorimetrinen proteiinien määritysmenetelmä
BSA	bovine serum albumin, boviiniseerumin albumiini
CPU	counts per unit, signaaliyksikkö
CYP	cytochrome P450, sytokromi P450
DDT	dithiothreitol, dithiothreitol
FVB/N	inbred mouse line, sisäsiittainen hiirikanta
GLP	good laboratory practice, hyvän laboratoriokäytännön periaate
KBP	kilobasepair, kiloemäspari eli tuhannen nukleotidin pituinen DNA- tai RNA-jakso
Menopaus	aika, jolloin naissukuhormonien tuotanto loppuu luonnostaan ja kuukautiset loppuvat ("vaihdevuodet")
OVX	ovarioiden kirurginen poisto
PGE2	prostaglandine E2, prostaglandiini E2
Postmenopausaalinen	vaihdevuosien jälkeinen vaihe
PPi	pyrophosphate (inorganic), epäorgaaninen pyrofosfaatti
Premenopausaalinen	vaihdevuosiä edeltävä vaihe
SHAM	toimenpide, jossa tehdään kaikki samat vaiheet kuin varsinaisessa toimenpiteessä ilman itse koetoimenpidettä

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston, lääketieteellisen tiedekunnan, biolääketieteen laitoksen, anatomia ja solubiologian osastolla talven 2011-2012 aikana. Tässä opinnäytetyössä käytettiin FVB/N taustaista siirtogeenistä hARO-Luc -hiirimallia. FVB/N on sisäsiittoinen hiirikanta ja sen hiiret on tuotettu parittamalla sisaruksia keskenään vähintään 20 sukupolven ajan. Tällä tavoin saadaan tuotettua hiiriä, jotka ovat perimältään lähes identtiset keskenään. FVB/N hiirikanta soveltuu moniin siirtogeenitutkimuksiin hyvin, koska sen ominaisuutena on tehokas lisääntyminen. (1, 2)

Tutkimuksessa käytettiin kahta hiirityyppiä OVX (n= 4) ja SHAM (n= 3). Hiiret olivat kahdeksan viikkoisia naaraita. OVX-hiirille on tehty toimenpide, jossa niiden munasarjat on poistettu ja SHAM-hiireille on tehty sama toimenpide ilman itse koetoimenpidettä, jotta molemmat hiirityypit kokevat saman stressin. SHAM-hiiret kuvastavat premenopausaalista tilannetta ja OVX-hiiret postmenopausaalista tilannetta.

Tähän tutkittavaan hiireen on siirretty ihmisen aromataasigeenin koko eksoni 1-säätelyalue yhdistettynä lusiferaasireportterigeeniin, jotta saataisiin tilanne hiiressä muistuttamaan mahdollisimman paljon tilannetta ihmisessä. (3) Eksoni 1 -alueen aktivoitumista mitattiin lusiferaasiaktiivisuutena ja mittaustulokset suhteutettiin näytteiden proteiinipitoisuuteen. Aromataasigeenin ilmentymistä tutkittiin eri kudoksissa, mutta erityisesti rasvakudoksissa.

Tutkimuksessa haluttiin selvittää, miten hyvin käytetty hiirimalli kuvastaa tilannetta ihmisessä. Premenopausaalisilla naisilla valtaosa estrogeeneista tuotetaan munasarjoissa, kun taas postmenopausaalisilla naisilla valtaosa estrogeeneista tuotetaan rasvakudoksessa. Postmenopausaalisilla naisilla elimistön korkea estrogeenipitoisuus on yhteydessä lisääntyneeseen rintasyövän riskiin. (4)

Hiirellä aromataasin ilmentyminen muissa kuin sukupuolirauhasissa, on vähäistä, joten tämä eroaa merkittävästi ihmisen aromataasigeenin ilmentymisestä. Lisäksi hiiren aromataasigeenin säätelyalue poikkeaa merkittävästi ihmisen aromataasigeenin säätelyalueesta. Näin ollen hiiri ei sellaisenaan hyvin sovellu aromataasin ilmentymisen tai aromataasin säätelyn tutkimukseen.

Tässä työssä testattiin miten hyvin äskettäin kehitetty hARO-Luc -hiirimalli kuvastaa aromataasin säätelyä ja ilmentymistä gonadaalisissa kudoksissa, erityisesti rasvakudoksissa. Hiirimallin toimiessa, voidaan tutkia aromataasin ilmentymistä sääteleviä tekijöitä.



## 2 ESTROGEENIT JA RINTASYÖPÄRISKI

Rintasyöpä on tänä päivänä Suomessa naisten yleisin syöpä, jota todetaan vuosittain yli 4000 uutta tapausta. Melkein joka yhdeksäs nainen sairastuu jossain elämänsä vaiheessa rintasyöpään. Naiset, jotka ovat yli 45 ikävuoden sairastuvat yleisemmin rintasyöpään. Sairauden toteamishetkellä potilaiden keski-ikä on ollut hieman yli 60 vuotta. Miesten rintasyöpä on harvinaisempi, sillä Suomessa todetaan vain noin 15 uutta tapausta vuodessa. (4, 5, 6, 8)

Vuosien aikana taudin ennuste on parantunut, koska se pystytään diagnosimaan aikaisessa vaiheessa ja hoitokeinot ovat myös kehittyneet entistä tehokkaammiksi. Nykyään suurin osa rintasyöpäpotilaista elää täysin normaalia elämää ja yli 88 % heistä on elossa viiden vuoden jälkeen taudin toteamisesta. (4, 5)

Rintasyöpä syntyy kuten muutkin syövät. Se saa alkunsa maitorauhasen rauhasrakkuloista ja tiehyistä. Niissä solut alkavat jakautua runsaasti ja hallitsemattomasti, mutta pysyvät silti tiukasti kiinnittyneinä toisiinsa ja ympäröivään säikeiseen tyvikalvoon. Myös terveillä naisilla tapahtuu näitä solumuutoksia. Toisilla sairaus kuitenkin etenee pahanlaatuiseksi syöväksi, koska epiteelirakenne hajoaa, jolloin syöpäsolut tunkeutuvat ympäröivään kudokseen ja suoniin muodostaen etäpesäkkeitä. (5, 6, 7)

Pahanlaatuisen rintasyöpäkasvaimen kehittyminen on hidasta, koska tapahtumaan menee yleensä monta vuotta. Tämä tapahtuu monesti huomaamatta, joten on tärkeää, että rintasyöpä havaitaan ajoissa, muuten se saattaa levitä muualle kehoon esimerkiksi luustoon tai keuhkoihin. (5, 6)

### 2.1 Aromataasi ja estrogeeni

Aromataasi on entsyymi, joka katalysoi testosteronin muodostumista estrogeeniksi. Androgeenit muuttuvat elimistössä estrogeeneiksi aromataasientsyymin toimesta. (9, 10)

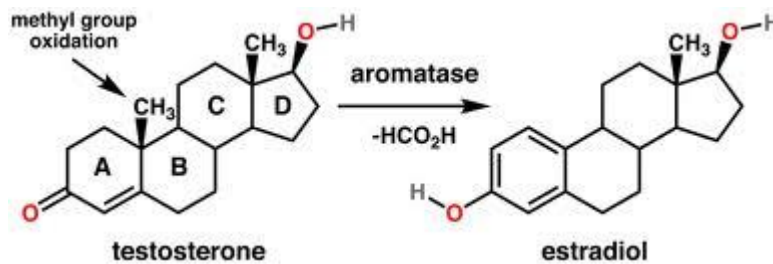
Aromataasientsyymi kuuluu CYP450-entsyymien perheeseen, jonka jäsenet osallistuvat elimistössämme muun muassa lääke- ja vierasaineiden aineenvaihduntaan sekä steroidihormonien tuotantoon (11). Aromataasientsyymi on elimistön estrogeenitehdas. Aromataasientsyymi tuottaa estrogeenejä androgeeneistä kolmivaiheisen katalyyttisen reaktion välityksellä (kuva 1). Elimistössämme ei ole muuta entsyymiä, joka pystyisi tällaiseen vastaavanlaiseen reaktioon, joten aromataasi on hyvin tärkeä tekijä estrogeenien tuotossa. (10, 12)

Tuotetut estrogeenit sitoutuvat normaalin solun tumassa oleviin reseptoreihin ja aiheuttavat solunjakautumisen. Näin tapahtuu myös rintasyöpäkasvaimessa, toisin sanoen estrogeenit pitävät yllä syöpäkasvaimen kasvua. Syöpäkudoksen solut saavat estrogeeninsa paikallisesti, jolloin juuri tämän paikallisen tuotannon rajoittaminen on tärkeää kasvaimen kasvun rajoittamisessa. (10)

Estrogeenit ovat sukupuolisteroideja, jotka säätelevät naiselle ominaisia sukupuoliominaisuuksia, muun muassa kohdun ja limakalvojen toimintaa. Niitä muodostuu munasarjoissa ja jonkin verran lisämunuaisissa ja rasvakudoksessa. (13)

On osoitettu, että estrogeeneillä on merkittävä rooli rasva- ja sappiaineenvaihdunnassa. Ne kykenevät muokkaamaan hormonien sekä rasva- ja sappihappojen pitoisuuksia. Niillä on myös merkittävä rooli hormonaalisissa rinta- ja eturauhassyövissä sekä hermosolujen sairauksissa. (14)

Estroni ( $E_1$ ), estradioli ( $E_2$ ) ja estrioli ( $E_3$ ) ovat naisen luonnollisia estrogeeneja, mutta näistä tehokkain on estradioli, joka on muodostunut testosteronista tai androseenidionista (kuva 1) 17beta-hydroksisteroidiksidoreduktaasin toimesta (10, 12, 13). Estrogeenibiosynteesin prekursorit, androgeenit ovat muodostuneet kolesterolista monivaiheisen reaktiketjun kautta. Estriolia muodostuu estronista ja estradiolista maksassa. (13)



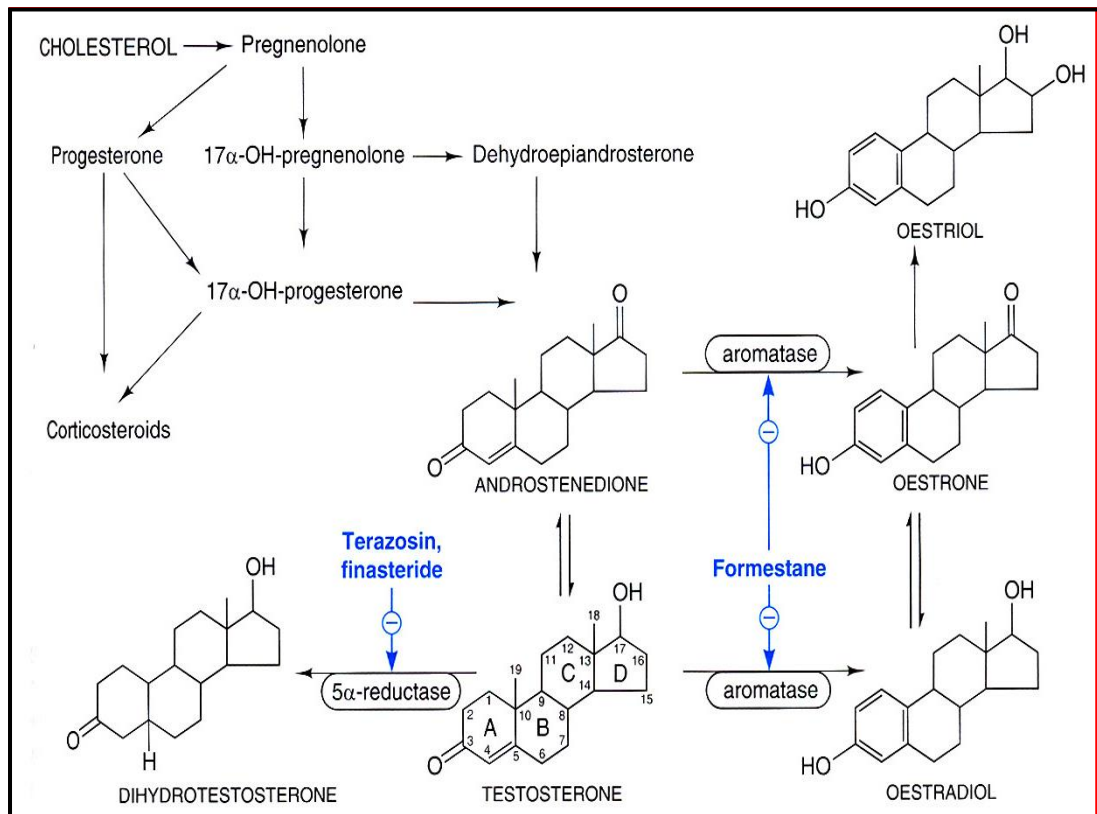
Kuva 1. Estradiolin muodostuminen testosteronista aromataasientsyymin avulla. (15)

Kuvassa 1, testosteronin metyyliiryhmä hapettuu eli luovuttaa vedyn ja sen vety kiinnittyy ketoniryhmän happeen. Tämä on sen takia, koska vety kiinnittyy siihen sidokseen, jossa on jo entuudestaan vähiten vetyatomeja. A-renkaan ketoniryhmä muuttuu näin ollen hydroksyyliiryhmäksi ja A-rengas muuttuu fenoliksi.

Naisen tärkein estrogeeni hedelmällisessä isässä on estradioli ja sitä muodostuu premenopausaalisilla naisilla eniten munasarjoissa. Estradiolin pitoisuus vaihtelee luontaisesti kuukautiskierron mukaan, ollen korkeimmillaan ovulaation aikana ja alhaisimmillaan kuukautisaikaan. Estradiolin tasot naisissa vähentyvät iän myöten ja suurta vähentymistä ilmenee menopausin aikaan. (16) Vaihdevuosien jälkeen estradiolin pitoisuus on pieni ja tällöin tärkein estrogeeni on aromataasientsyymin tuottama estroni (kuva 2). (13)

## 2.2 Lihavuus ja rintasyöpäriski

Ennen vaihdevuosia munasarjat tuottavat etupäässä estrogeenia, mutta vaihdevuosien jälkeen hormonia syntyy myös muissa kudoksissa, esimerkiksi maksassa, rasvakudoksessa mukaan lukien rintojen rasva, rintalihaksissa ja lisämunuaisissa. Rintasyövän riskiä voi mahdollisesti lisätä, jos käyttää pitkäaikaisesti ehkäisytabletteja, koska ne vaikuttavat estrogeenitasoihin. (4)



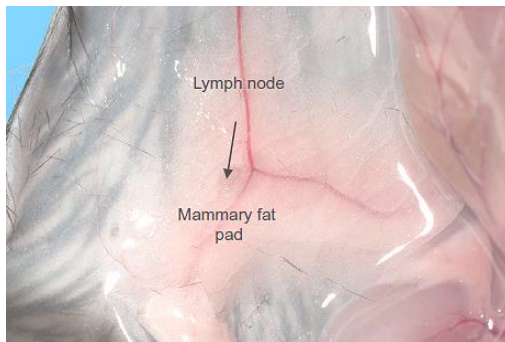
Kuva 2. Estrogeenien tuottaminen androgeeneistä aromataasin avulla. (17)

Kaikki vaikuttavat rintasyöpäriskiin, esimerkiksi liikunta, ruokavalio, alkoholi, tupakointi ja ympäristötekijät. Säännöllinen liikunta ja terveellinen, tasapainoinen ruokavalio vähentävät oletetusti rintasyövän riskiä. (4, 5)

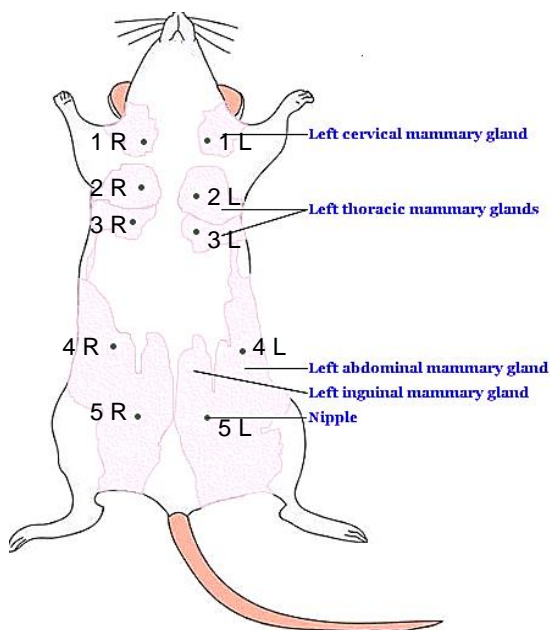
Tutkimusten mukaan lihavuus on riskitekijä hormonireseptori (HR)-positiiviselle rintasyövälle postmenopausaalisissa naisissa, toisin sanoen vaihdevuosien jälkeisen ylipainon on osoitettu lisäävän rintasyövän riskiä perustuen kohonneeseen aromataasin ilmentymiseen ja aktiivisuuteen rasvakudoksessa. (4, 18, 19) HR-positiivista rintasyöpää säätelee estrogeenit ja estrogeenien synteessin nopeuden rajoittavana tekijänä toimii aromataasi. (19, 20)

### 3 IHMISEN JA HIIREN MAITORAUHASET

Maitorauhanen on avoeritteinen rauhanen, joka erittää synnytyksen jälkeisenä aikana maitoa (kuva 3). Ihmisillä on maitorauhasia yksi pari, kun taas hiirillä on niitä viisi paria (21, 22). Hiiren kaksi paria ovat vatsanpuoleisissa imusolmukkeiden alueella ja kolme muuta paria ovat vatsanpuoleisella rintakehän alueella. (kuva 4) (21)



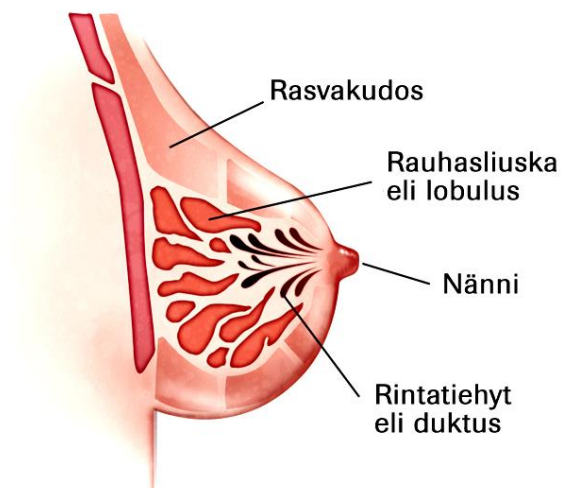
Kuva 3. Hiiren maitorauhanen ja imusolmuke. (21)



Kuva 4. Kuvassa on hiiren viisi rauhasparia. L tarkoittaa vasenta puolta ja R oikeanpuoleista. (23, 24)

Maitorauhaset kuuluvat ihon rauhasiin, jotka ovat kehittyneet suurista hikirauhasta. (25, 26) Maitorauhaset kehittyvät varsinkin murrosiässä estrogeenien vaikutuksesta. (27, 28)

Hiirellä on vain yksi monimutkainen maitorauhasjärjestelmä, jolla ei ole erillisiä lohkoja, kun taas ihmisellä on 15–20 erillistä pikkurauhasta, lohkoa. (21, 22) Ihmisen maitorauhasia on kahta tyyppiä, inaktiiviset ja aktiiviset, ja ne koostuvat edellä mainituista erillisistä lohkoista, joiden yhdistäjänä toimii sidekudoksinen väliseinä (kuva 5). Inaktiivinen maitorauhanen muodostuu pääasiassa maitotiehyistä ja itse rauhasen osuus on vähäinen. (29)



Kuva 5. Ihmisen rinnan poikkileikkaus, josta näkyy maitorauhasen erilliset lohkot. (21)

## 4 GEENIMUUNNELLOT ELÄIMET

Geenimuunnellut eläimet voidaan jakaa siirtogeenisiin ja poistogeenisiin eläimiin. Geenimuunneltu eläin tarkoittaa siis sitä, että eläimen perimää on muokattu ja tämä perimä siirtyy jälkeläisille. Siirtogeeniset eläimet ovat geenimuunneltuja eläimiä, jotka ilmentävät viety vierasta DNA:ta. (30, 31)

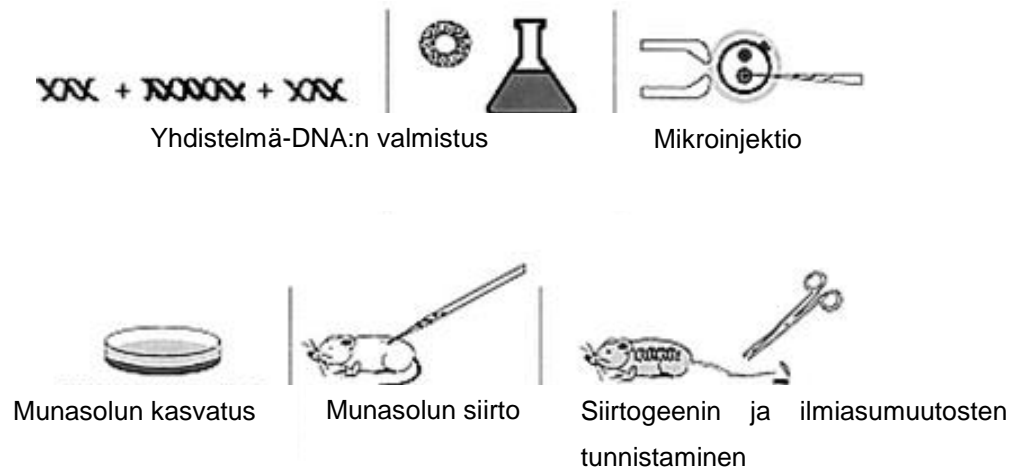
Geenimuunneltuja hiiriä käytetään eniten geenisäätelyn tutkimisessa. Niitä käytetään myös tautimallinnuksessa ja lääkekehityksessä. (30, 31) Tautimallinnuksessa pyritään geenimuuntelun avulla luomaan hiirelle tila, joka muistuttaa mahdollisimman paljon ihmisen sairautta. (30) Hiiriä on käytetty koe-eläiminä, koska yli 80 % niiden geeneistä ovat samoja kuin ihmisellä. (28)

### 4.1 Siirtogeeniset hiiret

Siirtogeenisessä hiiressä perimään liitetään ylimääräinen uusi geeni, joka on yleensä rekombinantti-DNA -tekniikalla rakennettu fuusiogeeni. Siirtogeenisen hiiren tuottamisessa on viisi vaihetta (kuva 6). (30)

Siirtogeenisen hiiren tuottaminen mikroinjektiotekniikalla (30, 32):

1. Geenitekniikan avulla rakennetaan yhdistelmä-DNA.
2. Injisoidaan DNA hedelmöittyneeseen munasoluun mikroinjektioilla.
3. Munasolua kasvatetaan laboratorio-olosuhteissa yleensä 1-2 vuorokautta.
4. Kehittyneet, hedelmöittyneet munasolut siirretään valeraskaiden vastaanottajahiirten munanjohtimiin.
5. Syntyneiden poikasten perimästä (genotyyppi) tunnistetaan siirtogeeni PCR:n avulla, joko häntä- tai korvanäytteestä eristetyistä DNA:sta.
6. Kantahiiret, jotka osoittautuvat siirtogeeniksi, käytetään siirtogeeniä ilmentävien hiirilinjojen tuottamiseen. Lopuksi ilmiäisun muutokset tutkitaan.



Kuva 6. Siirtogeenisen hiiren tuoton tapahtumasarja mikroinjektioilla. (33)

Siirtogeenisten hiirten avulla voidaan tutkia esimerkiksi geenin ylituoton vaikutuksia hiireen, dominantisti negatiivisen mutaation vaikutuksia tai transkription säätelyelementtejä, tästä esimerkkinä mainittakoon tutkittavat reportterihiiromme. (30)

#### 4.2 Koe-eläintoiminta ja siihen liittyvät eettiset kysymykset

Eläinkokeiden suorittaminen on luvanvaraista ja laissa hyvin tarkoin säädeltyä toimintaa. Luvan myöntämisestä päättää valtioneuvoston asettama eläinkoelautakunta. Koe-eläintoiminnalla tarkoitetaan laissa eläinten käyttöä eläinkokeisiin ja niiden pitoa eläinkokeita varten. Koe-eläimillä tarkoitetaan siis tutkimustarkoitukseen käytettäviä kaikkia selkärangkaisia eläimiä ja myös niiden eläviä toukkamuotoja. (kuva 7) (34, 38)

Lain tarkoituksena on varmistaa, että eläimiä pidetään ja käytetään koe-eläintoiminnassa vain tärkeistä ja tarpeellisista syistä. Lisäksi lain tarkoituksena on varmistaa, että eläinten käyttö on mahdollisimman vähäistä, ja että koe-eläintoiminnassa eläimille aiheutetaan mahdollisimman vähän kipua, kärsimystä, tuskaa tai pysyvää haittaa. (35, 36, 38)

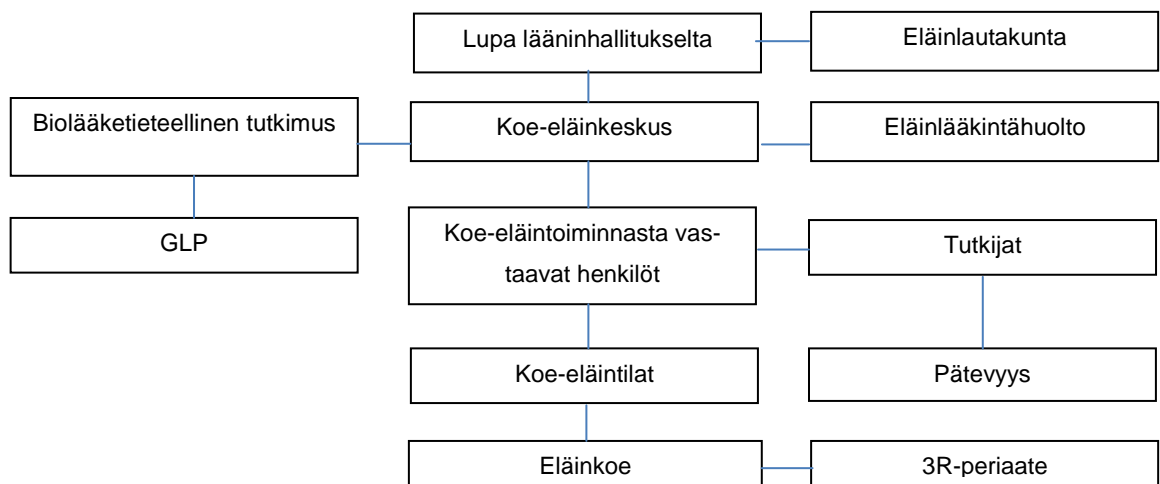
Tutkimuksen eläinkokeita suoritetaan 3R-periaatteita noudattaen. Tämä tarkoittaa sitä, että eläinkokeet tulee korvata muulla tieteellisellä menetelmällä aina, kun se on mahdollista (replacement, korvaaminen), eläinkokeissa käytettyjen eläinten määrä pitää olla pienin mahdollinen (reduction, vähentäminen) ja koe-



eläinten kohtelua pitää jatkuvasti parantaa ja niiden kärsimysten määrää vähentää (refinement, parantaminen). (35, 36, 37, 38)

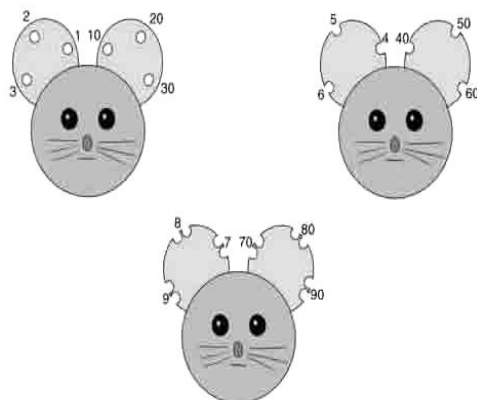
Eläinkokeita korvaavia menetelmiä ovat esimerkiksi solu- ja kudosisviljelyt. Muita vaihtoehtoisia tutkimusmenetelmiä ovat tietokonemallinnus, kivuntunnon kehittyvät eliöiden käyttö, mekaaniset mallit ja ihmisten tutkiminen (38)

Laitoksen, jossa harjoitetaan koe-eläintoimintaa, on haettava lääninhallitukselta lupaa tähän toimintaan. Jotta luvan saa, on laitoksessa harjoitettavaa koe-eläintoimintaa varten oltava asianmukaiset laitteet, välineet ja henkilökunta sekä riittävät tilat. Lisäksi koe-eläinlaitoksessa eläinlääkintähuolto pitää olla järjestetty lain edellyttämällä tavalla. Myös jokaista eläinkoetta varten on annettava lupa eläinkoelautakunnalta, joka arvioi täyttääkö koetta varten laadittu suunnitelma kaikki vaadittavat kriteerit. (kuva 7) (38)



Kuva 7. Koe-eläintoiminnan kaavio.

Tutkimuksessa käytetyt hiiret ovat identiteetin tunnistamiseksi korvamerkattuja, tarkoittaen sitä, että niiden korvat ovat rei'itetty ammattilaisen toimesta (kuva 8). Hiiret lopetettiin myös hyväksyttävällä menetelmällä, toisin sanoen niitä lopetettiin tainnuttamalla niitä hiilidioksidilla (< 70 %) tiiviissä muovilaatikossa (kuva 9), ja verenkaskulla varmistettiin niiden lopullinen kuolema. (39)



Kuva 8. Hiirten korvamerkinnot. (40)



Kuva 9. Hiiren tainnutus hiilidioksidilla.

Turun koe-eläin keskus, KEK on yliopiston palveluyksikkö, joka hankkii sekä tuottaa eläimet biolääketieteelliseen tutkimukseen. Se noudattaa Turun yliopiston laatu politiikkaa, ja se on läpäissyt viranomaisten GLP -tarkastuksen vuonna 2012. (35)

KEK:n ammattitaitoinen henkilökunta huolehtii eläinten päivittäisestä hyvinvoinnista. Tarvittaessa he voivat myös avustaa tutkijoita koetoimenpiteissä sekä kaikissa eläinkokeisiin liittyvissä kysymyksissä. (35)

#### 4.3 hARO-LUC -hiirimalli

Hiirissä aromataasin ilmentymä muissa kuin sukupuolirauhasissa on vähäistä. Ihmisissä aromataasin ilmentymä on runsasta sukupuolirauhasissa, etenkin premenopausaasilla naisilla. Postmenopausaalisilla naisilla ilmentymä sukupuolirauhasissa on vähäistä. (13) Ihmisellä aromataasigeenin säätely on kudosspesifistä ja eroaa merkittävästi hiiren oman aromataasigeenin säätelystä. Tämä tarkoittaa sitä, että ihmisen aromataasigeeni on monimutkaisempi kuin hiiren.

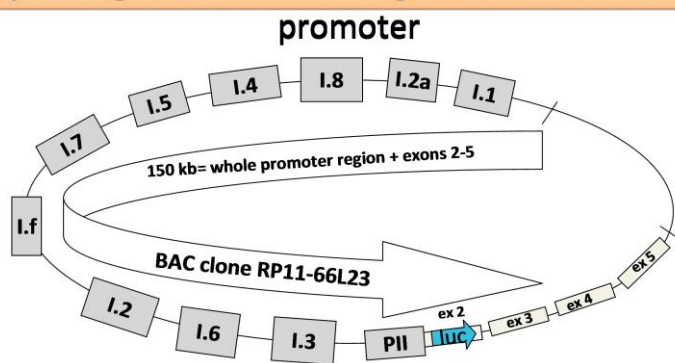
Näiden edellä olevien perusteiden vuoksi on kehitetty hiirimalli nimeltään hARO-Luc, joka on tehty FVB/N -hiirikantaan. FVB/N -hiiret ovat sisäsiitteisestä hiirikannasta. Hiirikannat on alkujaan tuotettu parittamalla sisaruksia keskenään vähintään 20 sukupolven ajan. Tämän jälkeen eläinyksilöt ovat lähes identtisiä perimänsä suhteen. Näiden hiirten käyttäminen vähentää tutkimuksessa tarvittavien eläinten määrää, koska tutkimustilanteessa vaihtelu yksilöiden välillä on vähäistä. (41)

hARO-Luc -reportterihiiromalli on kehitetty, jotta voitaisiin tutkia ihmisen CYP19A1 -geenin ilmentymisen säätelyä hARO-Luc -hiiressä. BAC-geeni, jolla on 90 kbp:n pitkä ihmisen P450-arom-5' -alue, on kiinnitetty lusiferaasi-reportterigeeniin (kuva 10). Hiirimallin lusiferaasin ilmentymisprofiili eri kudoksissa muistuttaa tunnettua ihmisen aromataasin ilmentymisprofiilia. (3)

Kun mikä tahansa näistä eksoni 1 -alueista aktivoituu, voidaan mitata se lusiferaasiaktiivisuutena kyseisessä kudoksessa. Mallissa ei tuoteta kuitenkaan aromataasi proteiinia, joka tarkoittaa sitä, että estrogeenien biosynteesi ei lisäännä vaikka lusiferaasi lisääntyy. Aromataasiaktiivisuuden sijasta mallissa mitataan lusiferaasiaktiivisuutta. Kun lusiferaasin ilmentymä lisääntyy jossain kudoksessa esimerkiksi käsittelyn seurauksena, myös aromataasi proteiinin määrä lisääntyy.

### **hAro-Luc mouse model**

A mouse model expressing firefly luciferase reporter gene under full-length human aromatase promoter



*Leena Strauss, Matti Poutanen et al. 2011*

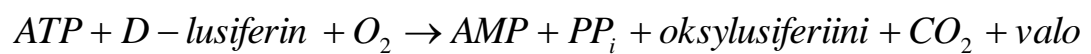
Kuva 10. hARO-Luc -hiirimalli, joka ilmentää ihmisen aromataasigeenin koko eksoni 1 -aluetta yhdistettynä lusiferaasireporterigeeniin. (3)

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Kerätyistä kudoksenäytteiden seerumifraktioista mitattiin lusiferaasiaktiivisuus ja näistä saadut tulokset suhteutettiin proteiinimäärityksestä saatuihin tuloksiin, jotta kudosten massan eroavaisuus kudosten välillä saatiin tasapainotettua.

### 5.1 Lusiferaasimittaus

**Määrityksen periaate, reaktioyhtälö:**



Analyysi on optimoitu antamaan maksimaalisen tason pysyvää valoa, jonka hajomisnopeus on alle 6 % / minuutti. Reaktiossa ATP-nukleotidi ja D-lusiferiini toimivat substraatteina. Näiden kahden substraatin lisäksi reagenssit sisältävät magnesiumioneja, PPi:a, DTT:a ja BSA:ta. Hapen kanssa, tulikärpäsen lusiferaasin katalysoimana ATP muuttuu AMP:ksi, kun se menettää kaksi fosfaattiryhmää. Reaktiosta syntyy valoa ja laite mittaa tätä havaittua valonmäärää luminesenssina.

### 5.2 Proteiinimittaus

Proteiinin määrittäminen on yksi yleisimmin käytetyistä biokemiallisista tutkimuksista. Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit on kaksikomponenttinen ja korkean tarkkuuden omaava proteiinimääritys. BCA-analyysi on riittävän herkkä tähän tarkoitukseen ja soveltuu hyvin proteiinimääritykseen. (liite 4)

Periaatteena on kahdenarvoisen kupari-ionin ( $Cu^{2+}$ ) proteiinikompleksin muodostuminen emäksisissä olosuhteissa, jota seuraa  $Cu^{2+}$ :n pelkistys  $Cu^{1+}$ -ioniksi. Pelkistyksen määrä on verrannollinen läsnä olevan proteiinin määrään. (liite 4)

On osoitettu, että kysteiini, kystiini, tryptofaani, tyrosiini, ja peptidisidos kykenevät pelkistämään  $\text{Cu}^{2+}$ :n  $\text{Cu}^{1+}$ :ksi. BCA muodostaa violettisäsinen kompleksin  $\text{Cu}^{1+}$ :n kanssa emäksisissä ympäristöissä. Mittaus suoritetaan maksimaalisella absorbanssilla aallonpituudella 562 nm. (liite 4)

## 6 TYÖN SUORITUS

Turun koe-eläinkeskuksessa (KEK) on käytössä ELLI-järjestelmä, joka on reaaliaikainen eläinkirjanpito- ja lupahallintajärjestelmä. Tutkijalla on henkilökohtainen internetselainpohjainen liittymä, johon hänellä on tunnukset joilla hän pääsee lähettämään eläimiään koskevia ohjeita ja työtilauksia Koe-eläinkeskuksen henkilökunnalle sekä näkemään eläinyksilön tiedot. Järjestelmä antaa myös jokaiselle hiirelle yksilöllisen ID-numeron eli tunnuksen, jolla tutkija pääsee tarkastelemaan hiiren tiedot. (34)

### 6.1 Esivalmistelu

Kudosnäytteille merkittiin koodinumeroin eppendorf-putket. Putkiin merkittiin ensin tutkimuksen nimi ja sen jälkeen riippuen mistä kudoksesta on kyse, kudoksen nimi esim. FB5-K-1 (K= kidney = munuainen, 1= hiiri nro 1). Hiiriä oli yhteensä 7 kappaletta, joista 3 hiirtä olivat kontrolleja ja 4 ovariektomoituja eli niistä on munasarjat poistettu. Maitorauhasille (mammary glands) merkittiin kaksi koeputkea yhtä hiirtä varten, koska tutkimme molempia maitorauhasen puolia, sekä vasenta että oikeata maitorauhasta (pari numero 4).

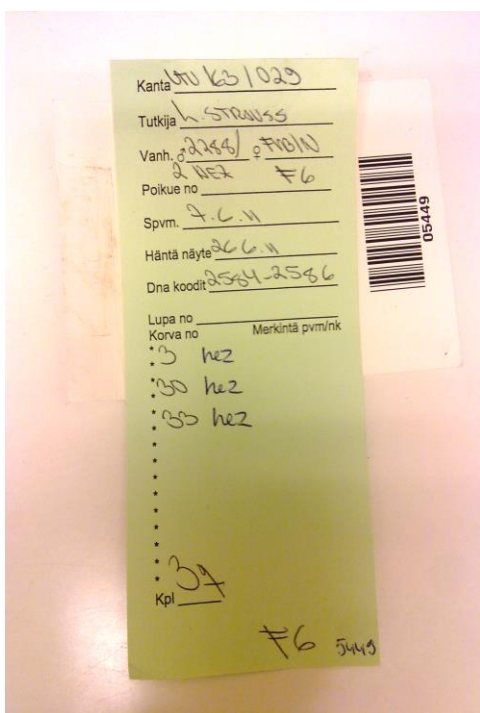
### 6.2 Näytteiden keruu

Näytteidenottotilanteessa noudatettiin GLP:n mukaista suojavaatetusta ja asianmukaista työtapaa. Ennen käsittelyhuoneeseen tuloa riisuttiin ulkovaatteet ja jätettiin ne niille tarkoitettuun kaappiin, jonka jälkeen laitettiin kengän suojat, kasvosuoja, päähine, hanskat ja laboratoriotakki tai kertakäyttöinen suojapuku (kuva 11).



Kuva 11. Esimerkkikuva koe-eläintyöskentelystä.

Hiiret haettiin häkki kerrallaan toisesta huoneesta käsittelyhuoneeseen. Jokaisella hiirellä on henkilötietokorttinsa, johon on merkattu hiiren korvamerkit tunnistamiseksi (kuva 12).



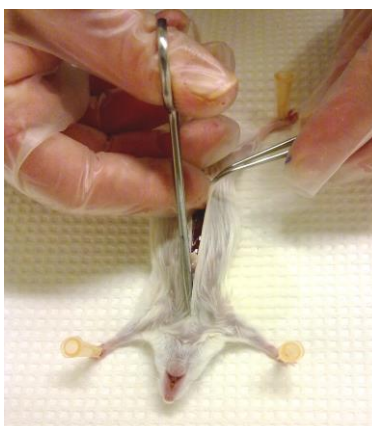
Kuva 12. Hiirten henkilökortti, josta näkee niiden syntymäajat, DNA-koodit, vanhemmat, kannan, korvanumerot ja kappalemäärän.



Hiiret tainnutettiin hiilidioksidilla tiiviissä muovilaatikossa yksitellen sitä mukaan, kun niitä alettiin lopettaa. Tainnutuksen jälkeen hiiri punnittiin ja varmistettiin sen kuolema poistamalla ruiskulla kaikki veri (39). Yhdestä hiirestä saatiin noin 1 ml verta. Tämän jälkeen asianmukaisesti kerättiin halutut näytteet nopeasti, koska kuoleman jälkeen hiiren kudoksissa alkaa tapahtua muutoksia (kuva 13). (39)

Kudokset kuten maitorauhaset, rasvat, aivot, reisiluut, ja muut elimet otettiin talteen leikkaamalla. Näytteet laitettiin merkattuihin eppendorf-putkiin ja putket nestetyppeen ( $N_2$ ). Preparoinnin jälkeen hiiri sekä muut jätteet hävitettiin asianmukaisesti (39).

Varsinaisessa tutkimuksessa hiiriä oli yhteensä seitsemän kappaletta, joista kolme on SHAM-hiiriä ja neljä OVX-hiiriä. Hiiret olivat naaraita ja kahdeksan viikon ikäisiä. Jatkotutkimuksessa oli yhteensä 24 hiirtä, 10 niistä oli pelletointitutkimukseen ja 14 niistä oli iän ja eri maitorauhasen vaikutuksen tutkimiseen.



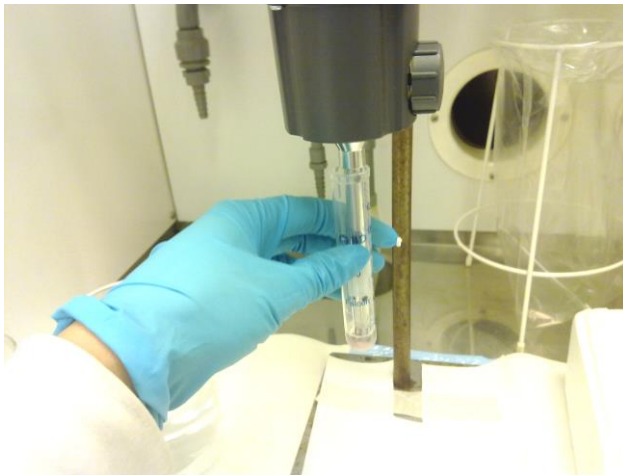
Kuva 13. Tutkimushiiren preparoiminen.

Verinäytteet sentrifugoitiin 7 minuuttia (3420 G voimalla), jonka jälkeen ylin serumifraktio erillisiin eppendorf-putkiin ja laitettiin pakastimeen ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kerätyt kudospäytteet lajiteltiin kudosten mukaan ja ne laitettiin minigrip-pusseissa pakastimeen ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 6.3 Homogenointi ja sentrifugointi

Kudosten homogenointia varten valmistettiin 100 ml hajotuspuskurin kantaliuosta 2.2.2011 päivitetyn ohjeen (liite 3) mukaisesti. Kantaliuoksesta valmistettiin

tarvittava tilavuus hajotuspuskuria homogenointia varten. (liite 9) Näytekudokset otettiin pakastimesta (-80 °C) hiilihappojäihin (kuivajäihin, CO<sub>2</sub>). Kudokset siirrettiin yksitellen koodinumeroin merkattuihin Falcon-putkiin, joihin oli pipetoitu kullekin kudokselle sopiva määrä hajotuspuskuria suhteessa kudoksen kokoon. Kudoksenäytettä homogenoiitiin (noin 10 sekuntia 2 sekunnin osissa) Ultra-turraxilla, voimakkuudella 5, jolloin sen kierrosnopeus on 22 000- 24 000 1/min (kuva 14). Kunkin näytteen jälkeen turraxin sekoituspää pestiin kolme kertaa tislatussa vedessä ja kerran hajotuspuskurissa. Pesuliuokset vaihdettiin noin 10 näytteen jälkeen riippuen näytteistä. Homogenoidut näytteet pidettiin koko ajan jäissä, koska näytteiden lämpeneminen aiheuttaa lusiferaasiaktiivisuuden vähenemistä. Homogenoidut näytteet siirrettiin Falcon-putkista eppendorf-putkiin ja ne sentrifugoitiin (+ 4 °C) 30 minuuttia (3420 G voimalla). Eppendorf-putket laitettiin sentrifugiin niin, että roottori oli tasapainossa. Sentrifugoinnin jälkeen kerättiin toisiin merkattuihin eppendorf putkiin ylemmästä faasista supernatanttiliuos (sisältää lusiferaasiaktiivisuutta) talteen. Alempi faasi, jossa on enää kudomassaa, heitettiin pois. Lusiferaasinäyte säilytettiin pakastimessa (-80 °C). Suositeltu säilytysaika oli noin viikko, jona aikana lusiferaasi- ja proteiinimittaukset pyrittiin tekemään.

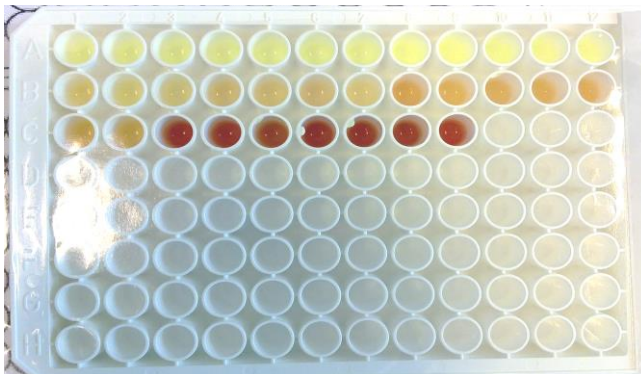


Kuva 14. Näytteen homogenointi Ultra-turraxilla.

#### 6.4 Lusiferaasimittaus

Otettiin yksi D-lusiferiini-pullo ja yksi ATP-pullo pakastimesta huoneenlämpöön noin tunti ennen liuotusta. Lisättiin 10 ml TRIS-EDTA puskuriliuosta D-lusiferiiniin ja 12 ml ATP:hen. Ensimmäiseen mittauksessa käytetyn 96-

kuoppalevyn riviin pipetoitiin hajotuspuskuria ja muihin tarvittaviin kuoppiin 20 µl näytettä (kuva 15). Hajotuspuskuria käytettiin taustana. Näytteet, jotka tiedettiin antavan suuria signaalitasoja, sijoitettiin levyn viimeisiin kuoppiin, jotta ne eivät vaikuttaisi viereisten alhaisia lusiferaasituloksia antaviin näytteisiin. Kuoppiin lisättiin myös 150 µl D-lusiferiinia ja ATP:tä laitettiin Victor-mittauslaitteeseen siten, että letkun kautta Victor imaisee ATP:tä kaikkiin kuoppiin saman verran. Lusiferaasimittaukset suoritettiin mittauslaitteeseen ohjelmoidun UTU 163- ohjelman mukaisesti (liite 6).

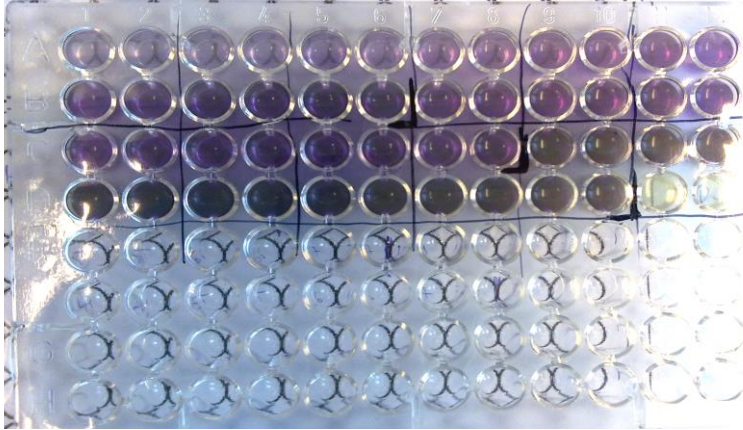


Kuva 15. Näytteet ovat pipetoituina kuoppalevyyn lusiferaasimittauksia varten. Tarrasuojia on laitettu levyn päälle kuljettamisen ajaksi.

### 6.5 Proteiinimittaus

Homogenoiduista kudospäätelystä kerätty supernatanttiliuos otettiin pakastimesta jäihin sulamaan. Supernatanttiliuokset laimennettiin 1/10 (10 µl näytettä + 90 µl PBS). Pakastimesta otettiin valmiiksi valmistettua BSA-PBS-liuos sulamaan jäihin, jota käytettiin kantaliuoksena standardiliuoksiin. Mittauksia varten valmistettiin sivun 29 mukaiset standardiliuokset ja WR -liuosta pipetoimalla BCA -määrityssarjasta A- ja B-reagenssia suhteessa 50:1. Valmistettiin hajotuspuskuri-PBS -liuosta suhteessa 1:9, jotta vastaisivat näytteiden laimennossuhteita. Pipetoitiin ensin 25 µl nollanäytettä, hajotuspuskuri-PBS-liuosta taustaa varten liite 4 työohjeen mukaisesti kuoppiin. Seuraavaksi pipetoitiin standardiliuokset laimeimmasta väkevimpään ja lopuksi näytteet. Kaikki pipetoitiin rinnakkaisina kuoppiin. Kuoppiin lisättiin 200 µl WR-liuosta, jolloin värinmuutosreaktio alkoi ja tämän jälkeen laitettiin suoja kuoppalevyn päälle, jotteivät liuokset vahingossa-kaan roiskuisi pois kuopista. Kuoppalevy jätettiin 30 sekunniksi ravistelijalle ja

vietiin lämpökaappiin (37 °C) 30 minuutiksi, jolloin liuokset muuttuivat violetiksi (kuva 16) ja värinmuutosreaktio eteni mitattavaksi. Kudosten proteiinipitoisuus mitattiin Victorilla ohjelmoidulla BCA2-mittausohjelmalla (liite 7).



Kuva 16. Inkuboitu kuoppalevy, jossa on tapahtunut värinmuutosreaktio.

## 7 JATKOTUTKIMUS

Varsinaisen tutkimuksen tuloksista johtuen suoritettiin jatkotutkimus, jossa haluttiin tutkia plasebopelletin lisäysoperaation vaikutusta aromataasin ilmentymiseen. Maitorauhasen pelletoinnin ideana alun perin oli, että voidaan laittaa haluttua yhdistettä sisältävän pelletin maitorauhaseen ja pystyttäisiin tutkimaan ko. yhdisteen vaikutusta paikallisesti maitorauhasen aromataasigeenin ilmentymiseen. Geenin ilmentyminen havaitaan lusiferaasiaktiivisuutena hARO-Luc -hiirissä. Tutkimuksessa verrattiin hiiriä, joiden maitorauhaseen oli lisätty plasebopelletti ja hiiriä, joihin ei ole lisätty pellettiä. Intact -hiiret ovat käyneet saman leikkausoperaation kuin hiiret, joihin on lisätty pelletti. Näin ollen molemmat hiirityypit ovat kokeneet saman stressin. Haluttiin havainnoida, miten tutkittavien aineiden kantajat plasebopelleteissä vaikuttavat lusiferaasin ilmentymiseen. Ajatuksena oli, että voitaisiin laittaa esimerkiksi prostaglandiini E<sub>2</sub>-pelletti tai deksametasonipelletti, joiden tiedetään säätelevän aromataasin ilmentymistä ihmisen maitorauhasessa.

Haluttiin myös tutkia eri-ikäisten hiirten maitorauhasten aromataasigeenin ilmentymisen tasoa, koska postmenopausaalisilla naisilla on osoitettu, että aromataasin ilmentymisen rasvakudoksessa lisääntyy iän myötä. Näiden lisäksi haluttiin tutkia, miten eri maitorauhaset vaikuttavat aromataasin ilmentymiseen.

## 8 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tulosten tarkastelussa käytettiin Prism-ohjelmaa (GraphPad, Prism 6), jonka avulla saatiin piirrettyä kuvaajat joka kudokselle. Laskettujen tulosten keskiarvoista tehtiin pylväsdiagrammit ja kuvaajiin lisättiin tulosten väliset hajonnat.

Otokset ovat riippumattomia toisistaan ja tämän vuoksi valittiin ohjelmasta kaksisuuntainen T-testi. Valitun T-testin avulla tutkittiin, onko SHAM:n ja OVX:n tuloksissa tilastollisesti merkittävää eroa merkitsevyystasolla 0.05.

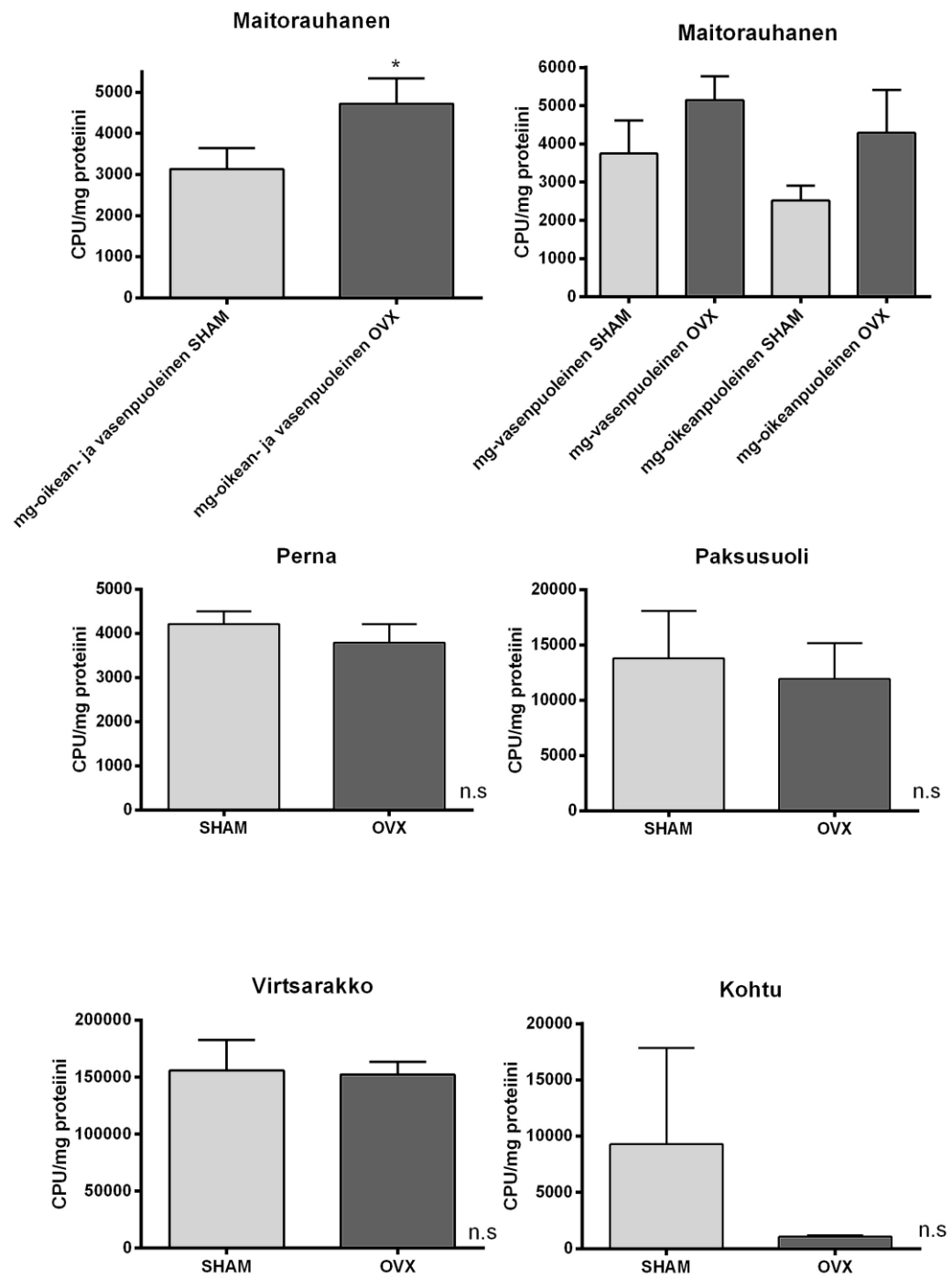
Jatkotutkimuksessa tarkasteltiin pelletin sijoittamisen ja käsittelemättömän hiiren tulosten eroja sekä hiirten iän että eri maitorauhasparien välillä. Jos tuloksissa oli eroa, pylvään päälle laitetaan tähti ja jos tuloksissa ei ollut tilastollisesti eroa, kuvaajaan laitetaan ns. (non-significant). Jos kuvaajassa on kaksi tähteä, tämä tarkoittaa, että tuloksissa on erittäin merkitsevä ero.

Kuviosta 1, huomaamme, että vain maitorauhasissa oli merkittäviä eroja SHAM- ja OVX-hiirten välillä. Ensin on laskettu vasen vs. oikea SHAM- ja OVX-hiirten maitorauhanen, mutta vasen SHAM-hiiren ja OVX-hiiren maitorauhasessa ei ollut merkittäviä eroja, vastaavasti oli oikeanpuoleisen maitorauhasen kanssa (kuvio 1). On kuitenkin oikeampaa tutkia maitorauhasparia, eikä maitorauhasta yksinään, joten piirsimme uuden kuvaajan, jossa on SHAM-hiiren vasen ja oikea maitorauhasen lusiferaasiaktiivisuus, myös toisen kuvaajan jossa on OVX-hiiren vasen ja oikea maitorauhasen lusiferaasiaktiivisuus (kuvio 1). Näissä oli yhden tähden verran eroa tuloksissa, koska OVX-hiiren lusiferaasiaktiivisuus oli noin 4500 CPU/mg proteiinia, kun taas SHAM-hiirellä oli vain noin 3000 CPU/mg proteiinia. Muissa kudoksissa ei ollut tuloksissa merkittäviä eroja (kuvio 2 & 3)

Jatkotutkimuksessa aloitimme kuitenkin pelleteimalla pelkkiä, jotta näkisimme, miten itse toimenpide vaikuttaa, koska haluttiin myöhemmin tutkia PGE2:n vaikutuksia, koska tiedetään sen säätelevän aromataasin ilmentymistä ihmisessä. Tulosten perusteella jo pelkkä plasebopelletin lisäysoperaatio sai aikaan maitorauhasessa selvän lokaalisen aromataasin ilmentymisen lisääntymisen (kuvio

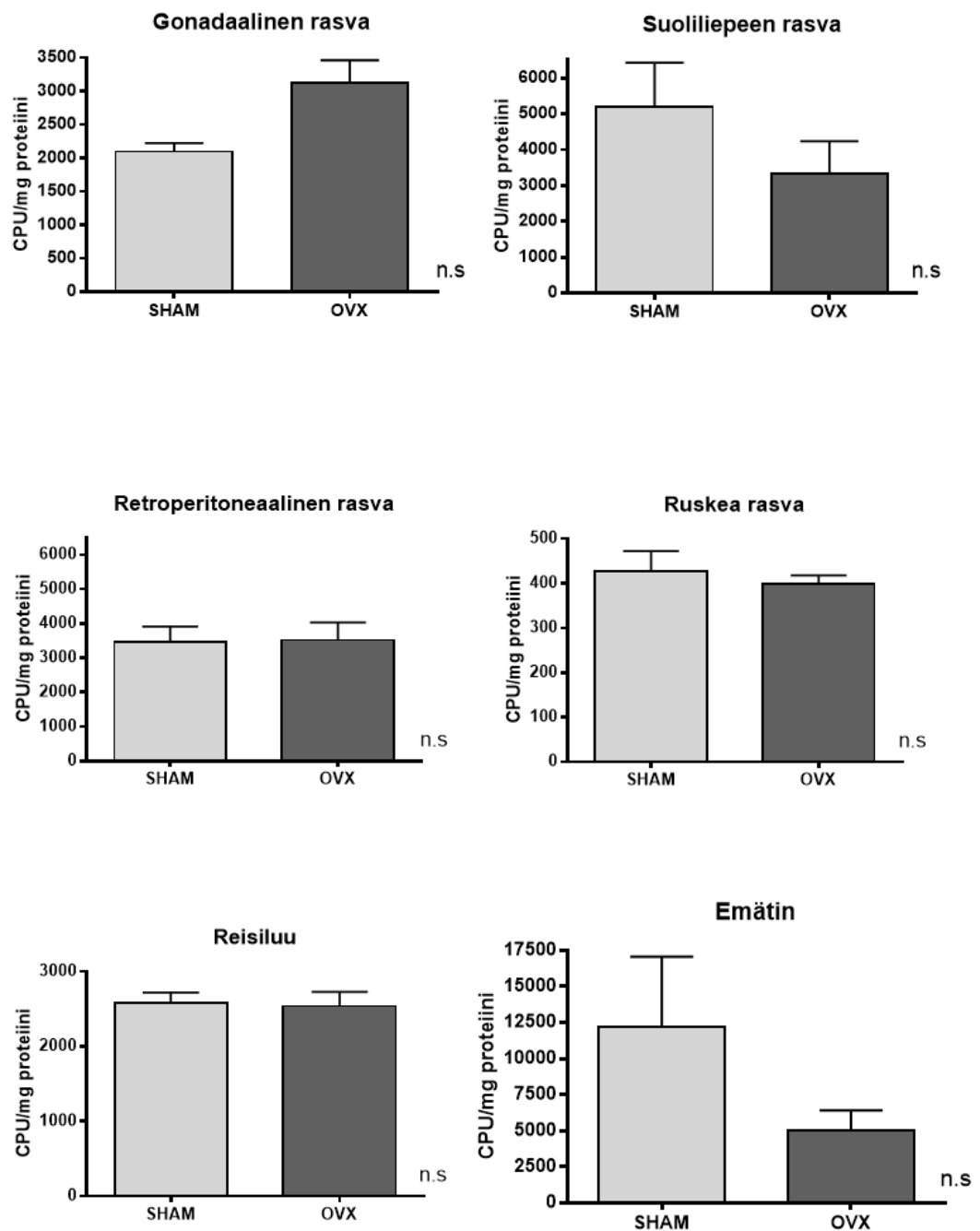
4). Mitä kauemmin pelletti oli maitorauhasessa (yksi päivä vs. kuusi päivää), sitä suurempi oli lokaalinen induktio. Tämä näkyi myös kuvio 4:n kuvaajista, jossa kuuden päivän kohdalla lusiferaasiaktiivisuus oli noin 7500 CPU/mg proteiinia, kun taas yhden päivän kohdalla oli vain noin 1250 CPU/mg proteiinia.

Jatkotutkimuksessa halusimme myös tutkia eri-ikäisten hiirten maitorauhasten sekä gonadaalisen (munasarjoja ympäröivä rasva) että retroperitoneaalisen (munuaisia ympäröivä) rasvan aromataasin ilmentymisen tasoa, mutta keskityimme kuitenkin enemmän maitorauhasiin. Postmenopausaalisilla naisilla on osoitettu, että aromataasin ilmentyminen rasvakudoksessa lisääntyy iän myötä. Tämä ei tullut selvästi esiin hiirillä, koska hiirten tuloksissa ei ollut merkittäviä eroja (kuvio 5). Yksittäisten eläinten maitorauhasen ilmentymät olivat kuitenkin korkeita vanhemmilla eläimillä. Samassa kokeessa verrattiin myös eri maitorauhasten välistä lusiferaasin ilmentymistä. Näissä ei ollut kuitenkaan merkittäviä eroja (kuvio 5).

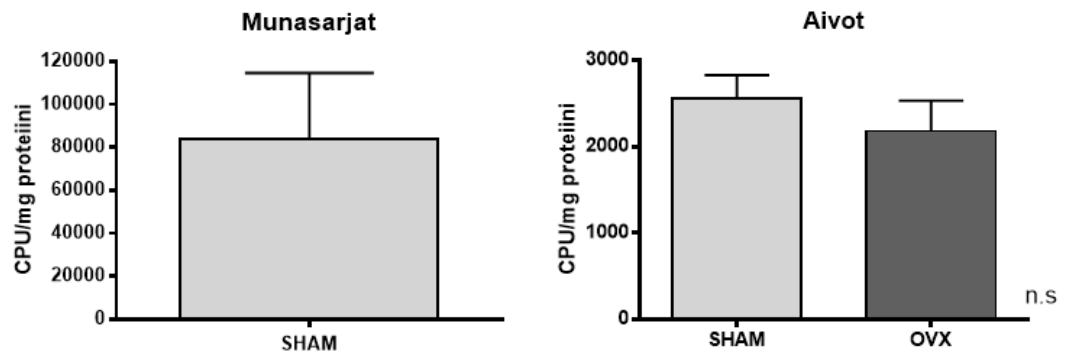


Kuvio 1. SHAM- ja OVX hiirten lusiferaasi-ilmentymät maitorauhaselle, pernalle, paksusuolelle, virtsarakolle ja kohdulle.





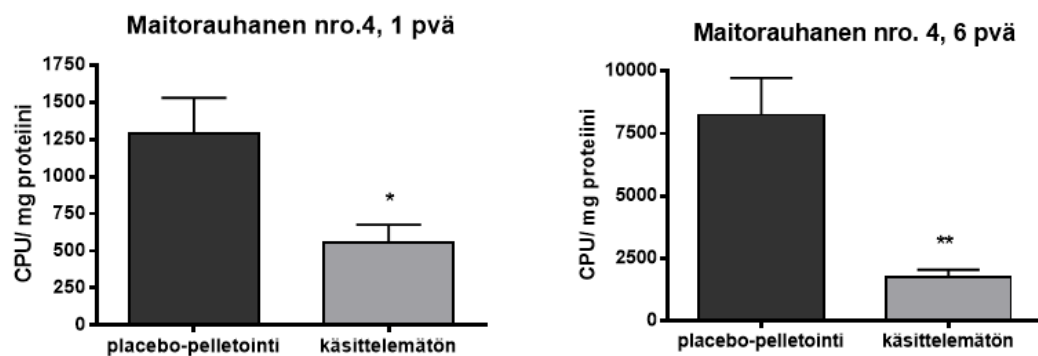
Kuvio 2. SHAM- ja OVX hiirten lusiferaasi-ilmentymät eri rasvoissa (gonadaalinen rasva, suoliliepeen rasva, retroperitoneaalinen rasva ja ruskea rasva) sekä reisiluussa ja emättimessä



Kuvio 3. SHAM- ja OVX hiirten lusiferaasi-ilmentymät munasarjoille ja aivoille. Munasarjoissa ei ole OVX-hiirille tuloksia.

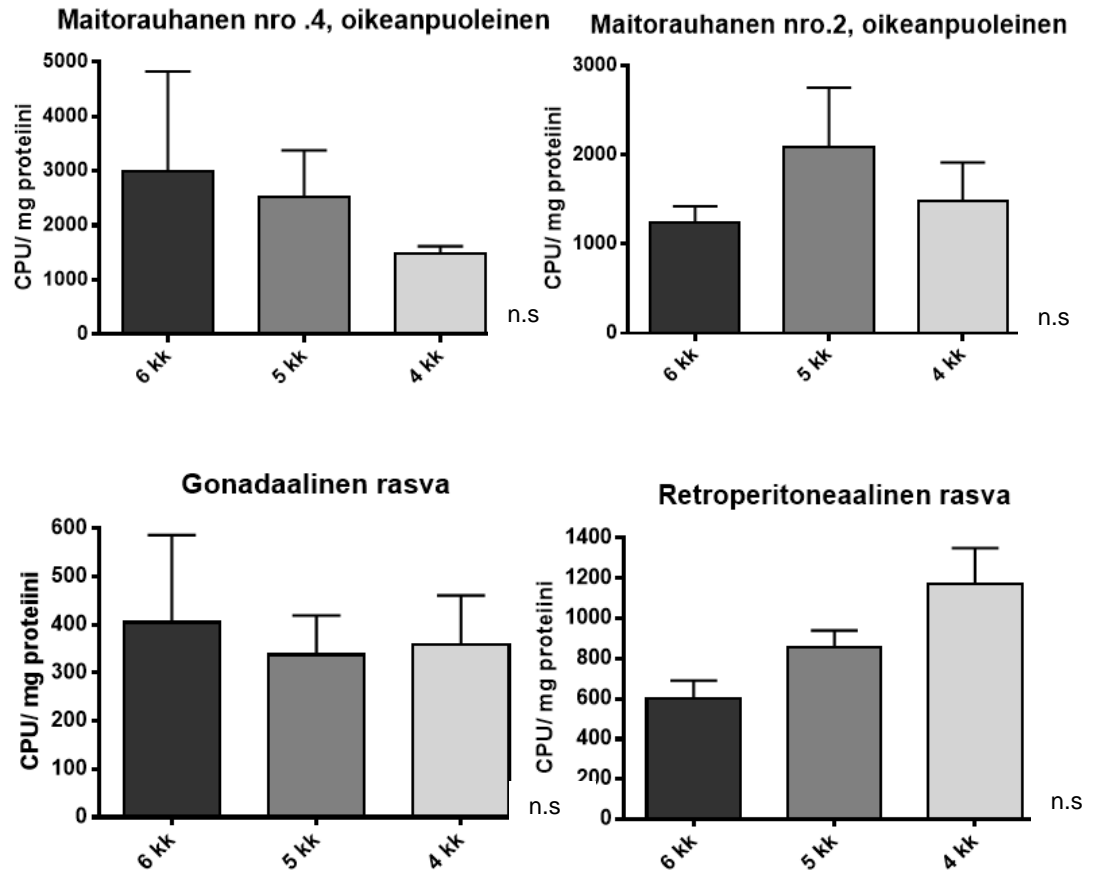
### 8.1 Jatkotutkimuksen tulokset

#### Maitorauhanen, placebo-pelleteoitu ja käsittelemätön



Kuvio 4. Plasebopelleteoitujen ja käsittelemättömien hiirten lusiferaasiaktiivisuus maitorauhasessa (numero 4). Toisessa pellettiä on pidetty yksi päivä ja toisessa kuusi päivää.

## Maitorauhaset, gonadaalinen ja retroperitoneaalinen rasva, eri-ikäiset



Kuvio 5. Eri-ikäisten (6 kk, 5 kk, 4 kk) hiirten maitorauhasten lusiferaasiaktiivisuudet. Toisessa on maitorauhanen numero 2 ja toisessa numero 4. Molemmat ovat oikeanpuoleisia. Kuviossa myös gonadaalisen ja retroperitoneaalisen rasvan lusiferaasiaktiivisuudet.

## 9 VIRHETARKASTELU

Tutkimuksessa käytettiin FVB/N -hiirikantaan tuotettua hiiriä, jotka ovat perimältään lähes identtiset keskenään. Näiden hiirten käyttäminen lisää edelleen tutkimusten luotettavuutta, sillä hiirten välillä ei ole merkittäviä eroja. Tutkimuksen virhelähteitä vähentämiseksi koe-eläimiä käsitteli sama tutkija ja lusiferaasin ja proteiinin mittauksissa oli myös ollut sama henkilö tekemässä ja joka vaiheessa on yritetty toimia samalla tavalla. Näytteitä pidettiin koko tutkimuksen ajan kylmässä, koska lämmitessään näytteistä saattaa hävitä lusiferaasiaktiivisuutta.

Melkein kaikki tutkimuksen vaiheet tehtiin käsin, lukuun ottamatta mittausvaihetta, jolloin Victor-laite itse mittaa aktiivisuudet. Laitteen antamista tuloksista jouduttiin kuitenkin laskemaan todellinen lusiferaasiaktiivisuuden suhde proteiinin määrään. Näissä on saattanut olla laskuvirheitä. Virhelähteiltä ei voida kuitenkaan välttyä, mutta minimoimalla ne tekemällä kaiken huolellisesti ja systemaattisesti, saamme parempia tuloksia.

Mahdollisia virhelähteitä, jotka ovat saattaneet vaikuttaa tutkimuksen tulokseen, ovat myös muun muassa pipetoinnit, reagenssit, välineiden puhtaudet, työvaiheet, laimennoslaskuvirheet, mittauslaitteen toimivuus tai muistiinpanomerkinnöissä on saattanut tapahtua kirjoitusvirheitä.

Kaikki laskut, pipetoinnin määrät ja työvaiheet on kirjoitettu huolellisesti ja tarkasti laboratorion työpäiväkirjaan, joka lisäsi tutkimuksen luotettavuutta, koska sieltä voitiin myöhemmin tarkistaa laskut ja tehdyt työt.

## 10 JOHTOPÄÄTÖKSET JA JATKOTUTKIMUKSEN

### POHDINTA

Tuloksista nähtiin, että OVX-hiiren maitorauhasen lusiferaasiaktiivisuus on korkeampi kuin SHAM-hiiressä. Tämä tarkoittaa sitä, että ovariektomia on saanut lusiferaasiaktiivisuuden nousemaan. Tämä edelleen tarkoittaa sitä, että vaihdevuosia ylittäneillä naisilla on suuremmat riskit sairastua rintasyöpään, koska lusiferaasiaktiivisuus on suoraan verrannollinen aromataasi-ilmentymään, joka on edelleen verrannollinen estrogeenin määrään, sillä suuri estrogeenin määrä viittaa suurempaan rintasyöpäriskiin.

Hiirimallimme toimii hypoteesimme mukaan, joka oli se, että estrogeenin taso maitorauhasissa postmenopausaalisilla naisilla on korkeampi kuin premenopausaalisilla. Tiedetään, että vaihdevuosi-ien jälkeen aromataasiaktiivisuus muualla kuin munasarjoissa on merkittävää. Tämä näkyi lisääntyneenä lusiferaasiaktiivisuutena.

Ovariektomia lisäsi nähtävästi eläinten painoa, mutta ruumiinpaino ei kuitenkaan suoraan korreloinut maitorauhasen lusiferaasiaktiivisuuden kanssa. Me emme kuitenkaan mitanneet rasvakudoksen määrää, joten emme osaa sanoa, jos lusiferaasi olisi korreloinut rasvakudoksen määrän kanssa. Hypoteesinamme on ollut kuitenkin, että lihavilla hiirillä, joilla on enemmän rasvakudosta, joissa on myös enemmän inflammaatiota, lisäävät aromataasi-geenin ilmentymistä.

Jatkotutkimuksessa nähtiin, että pelkän pelletin lisääminen aiheutti jo suuren lisäyksen lusiferaasiaktiivisuudessa. Nähtäväksi jääkin se, että johtuuko induktio pelletin kantaja-aineista vai aiheuttaako pelletti esimerkiksi inflammaatiota on vielä selvittämättä. Tästä on hyvä tehdä jatkotutkimus, kun halutaan selvittää vielä pelletoinnin vaikutusta. Selväksi kuitenkin tuli se, että kyseisellä menetelmällä ei tunnettujen aromataasin ilmentymisen stimulanttien, kuten PGE2 vaikutuksia kannata tutkia, koska jo pelkkä pelletti itsessään aiheuttaa niin merkittävän lusiferaasin lisääntymisen.

Myös muilla tutkimusryhmillä on erilaisia siirtogeenisiä hiirimalleja, jotka ilmentävät lyhyempiä pätkiä ihmisten aromataasigeenin säätelyalueesta, mutta näissä malleissa eksoni 1 osista koostuva säätelyalue on yhteydessä transloituvaan alueeseen (eksoni 2), toisin sanoen näissä malleissa myös tuotetaan aromaataasi proteiinia (20). Tämä tarkoittaa sitä, että muissa malleissa aromaataasi proteiinin lisäys näkyy lisääntyneenä estrogeenituotantona, kun taas tässä työssä käytetyssä hiirimallissa mitataan aromaataasituotannon sijasta lusiferaasiaktiivisuutta. Mallimme ei tuota itse aromaataasi proteiinia. Meidän hARO-Luc -hiirimallissamme on kuitenkin koko ihmisen aromataasigeenin säätelyalue yhdistettynä lusiferaasireportteriin, kun taas muissa malleissa on osia ihmisen aromataasigeenin säätelyalueesta.

Loppupäätelmänä on, että perustason vaihtelun minimoimiseksi on optimaalisinta käyttää noin 4 kk ikäisiä eläimiä ja välttää vanhojen naaraiden käyttöä. Tutkimuksemme tulos on se, että hiirimallimme soveltuu ihmisen aromaataasigeenin ilmentymisen säätelyn tutkimukseen.

Tätä kyseistä hiirimallia on käytetty tämän tutkimuksen jälkeen muissa projekteissa, esimerkiksi tutkimaan ruokavalion vaikutusta ihmisen aromaataasigeenin ilmentymiseen.

Jatkotutkimuksena voisi tutkia uudestaan eri-ikäisten hiirten vaikutusta lusiferaasiaktiivisuuteen, mutta suuremmalla mittakaavalla, käyttäen 1 kk, 5 kk ja 10 kk vanhoja hiiriä. Silloin voisi näkyä selvempiä eroja hiirten rasva- ja maitorauhaskudosten lusiferaasin ilmentymisessä.

Jatkossa voitaisiin myös tutkia muiden maitorauhasten välisiä eroja lusiferaasiaktiivisuudessa, esimerkiksi numero yhden ja viiden välisiä eroja. Hiirimallia käyttäen voidaan suorittaa muita tutkimuksia, esimerkiksi vertailla mahdollista eroja ihmisen aromaataasigeenin ilmentymisessä naaraiden ja koiraiden välillä maitorauhasissa ja muissa kudoksissa. Myös pelletointitekniikkaa voisi tutkia uudestaan esimerkiksi toisen yrityksen valmistamilla pelleteillä tai asettamalla pelletti toiseen paikkaan tai pyrkiä keksimään uuden keinon lisätä PGE2 muulla tavalla kuin pelleteillä.

## LÄHTEET

1. FVB/N transgeenihiiret, viitattu 2.4.2013  
[www.pnas.org/content/88/6/2065.full.pdf](http://www.pnas.org/content/88/6/2065.full.pdf)
2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 2065-2069, March 1991, Genetics, FVB/N: An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses
3. Strauss L et al, FASEB J 2013 Apr; 27 (4):1342-50
4. Rintasyöpä, Terveyskirjasto viitattu: 7.4.2013  
[www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00618](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618)
5. Rintasyöpä viitattu: 7.4.2013  
[www.cancer.fi/tietoasystovasta/syopataudit/rintasyopa/](http://www.cancer.fi/tietoasystovasta/syopataudit/rintasyopa/)
6. Rintasyöpä, viitattu: 7.4.2013 [www.rintasyopa.fi](http://www.rintasyopa.fi)
7. Syöpäsolut, viitattu 6.5.2013 [www.aka.fi/fi/A/Suomen-Akatemia/Mediapalvelut/Ajankohtaiset-uutiset/Syopasolu-murtaa-jarjestyneen-kudosrakenteen-oman-sorkkarautansa-avulla/](http://www.aka.fi/fi/A/Suomen-Akatemia/Mediapalvelut/Ajankohtaiset-uutiset/Syopasolu-murtaa-jarjestyneen-kudosrakenteen-oman-sorkkarautansa-avulla/)
8. Syövän ilmaantuvuus, syöpäpotilaiden ennuste ja syöpäkuolleisuus: Eero Pukkala, Tadeusz Dyba, Timo Hakulinen ja Risto Sankila viitattu: 7.4.2013  
[www.cancer.fi/@Bin/52456271/image\\_61\\_2.pdf](http://www.cancer.fi/@Bin/52456271/image_61_2.pdf)
9. Aromataasi, Endocrine Reviews June 1, 2009 vol. 30 no. 4 343-375 Published online before print April 23, 2009, doi: 10.1210/er.2008-0016, viitattu 04.04.2013 <http://edrv.endojournals.org/content/30/4/343.full.pdf+html>
10. CYP450 Aromataasi, Molecular Modelling of Estrogen-Producing Enzymes CYP450 Aromatase and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1, Karkola, Sampo (2009-02-28), viitattu 16.4.2013  
<http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-5186-9>
11. CYP450, viitattu 5.5.2013 [www.medicina.fi/fato/05.pdf](http://www.medicina.fi/fato/05.pdf)

12. Aromataasi, viitattu 17.4.2013  
[www.csc.fi/csc/julkaisut/tieteentietotekniikka/2009/2/uudet\\_laakeainemolekyylit](http://www.csc.fi/csc/julkaisut/tieteentietotekniikka/2009/2/uudet_laakeainemolekyylit)
13. Estrogeeni, viitattu 15.4.2013 <http://fi.wikipedia.org/wiki/Estrogeeni>
14. Castagnetta LA. Carruba G. & Traina A. ym. 1997. Endocrinology. 138. 4876-4882
15. Testosteroni, viitattu 21.5.2013  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Testosterone\\_estradiol\\_conversion.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Testosterone_estradiol_conversion.png)
16. Oestradiol, viitattu 25.4.2013  
[www.yourhormones.info/hormones/oestradiol.aspx](http://www.yourhormones.info/hormones/oestradiol.aspx)
17. Aromataasi ja inhibtio, viitattu 14.4.2013  
[www.slideserve.com/yamin/aromataasi-ja-sen-inhibitio](http://www.slideserve.com/yamin/aromataasi-ja-sen-inhibitio)
18. Kotha Subbaramaiah, Patrick G.Morris, Xi Kathy Zhou, et al 2012, Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in flamed breast tissue of obese woman, Cancer Discovery; 356-365
19. Dong Chen, Hong Zhao, John S. Coon V, Masanori Ono, Elizabeth K. Pearson, Serdat E. Bulun (2012), Weight gain increases human aromatase expression in mammary gland, Molecular and Cellular Endocrinology 355
20. Bulun SE, Chen D, Moy I, Brooks DC, Zhao H. 2012 February, Aromatase, breast cancer and obesity: A complex interaction, Trends Endocrinol Metb,
21. Rogers A. & Dintzis R. 2012. Mammary glands, Teoksessa Treuting P. Dintzis S. Frevent C. Liggitt D. & Montine K. Comparative Anatomy and Histology, a Mouse and Human Atlas. 2012, Elsevier. USA. 193-199



22. Nienstedt Hänninen, Arstila Björkqvist, 1987, Ihmisen fysiologia ja anatomia, WSOY
23. Maitorauhaset, viitattu 19.5.2013  
<http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/femaleu/mouseammgldiagram.html>
24. Maitorauhaset, viitattu 19.5.2013  
[http://ccm.ucdavis.edu/bcancercd/22/mouse\\_figure.html](http://ccm.ucdavis.edu/bcancercd/22/mouse_figure.html)
25. Maitorauhanen, Olendorf, Donna: Grzimek's Animal Life Encyclopedia: Mammals I (Volume 12), s. 36. Thomson, 2004. ISBN 0-7876-5788-3 viitattu 15.4.2013 <http://fi.wikipedia.org/wiki/Maitorauhanen>
26. Maitorauhaset, viitattu 20.5.2013 <http://candidas.fi/mirtina/bilsa/lho.pdf>
27. Maitorauhaset, viitattu 21.5.2013 <http://www.rintasyopa.fi/yleista/yleistietoa-rintasyopaan-sairastuneelle/>
28. H.A. Cole, The Mammary Gland of the Mouse, during the Oestrous Cycle, Pregnancy and Lactation, Dec 1, 1933
29. Maitorauhaset, viitattu 11.4.2013  
[www.solunetti.fi/fi/histologia/maitorauhaset/](http://www.solunetti.fi/fi/histologia/maitorauhaset/)
30. GM-eläimet, Koe-eläinkurssi, viitattu 11.4.2013  
<http://www.helsinki.fi/kek/pdf/ABCluennot2012suom/GM-el%C3%A4imet%20Koe-elkurs%20091112%20Petra.pdf>
31. Transgeeniset hiiret, genetiikan uusi ulottuvuus, Duodecim 11.1987 viitattu 14.4.2013 [www.terveysportti.fi/d-htm/articles/1987\\_11\\_675-678.pdf](http://www.terveysportti.fi/d-htm/articles/1987_11_675-678.pdf)
32. Strauss L. 29.10.2012. Transgeeniset kannat, geneettinen laadunvalvonta, alkioiden pakastaminen. Koe-eläinkurssi. Powerpoint-esitys

33. Siirtogeeniset hiiret, viitattu 16.6.2013  
<http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/zoology/AnimalPathology/TransgenicAnimals/TransgenicAnimals.htm>
34. Koe-eläinkeskus. KEK. 2009. Turun yliopisto. viitattu: 18.5.2013  
[www.animalcenter.utu.fi/kek/laatu/](http://www.animalcenter.utu.fi/kek/laatu/)
35. Koe-eläinkeskus. KEK. 2012. Turun yliopisto. viitattu: 18.5.2013  
[www.animalcenter.utu.fi/kek](http://www.animalcenter.utu.fi/kek)
36. Tuomisto, J. 1996. Eläinkoetoiminnan eettiset ja evaluation periaatteet ja vaihtoehdot koe-eläin käytölle. Teoksesta Nevalainen, T; Jaakkola, U; Kohila, T & Pudas, J. (toim.). Rottia tutkijoita tuloksia. Helsinki: FinLAS ry.
37. Salmi, R. 2005. Onko eläinkokeille vaihtoehtoja? Teoksesta Hirsjärvi, P; Mäkinen, J; Saunanoja, S. & Siitonen, A. (toim.). Koe-eläinetiikkaa. Helsinki: Yliopistopaino
38. Finlex 20.1.2006/62, viitattu 3.4.2013  
[www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20060062?search%5Btype%5D=pika&search%5Bpika%5D=koe-el%C3%A4in](http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20060062?search%5Btype%5D=pika&search%5Bpika%5D=koe-el%C3%A4in) (J)
39. Antal C. Teletin M. Wendling O. Dgheem M. Auwerx J. & Mark M. 2007. Tissue Collection for Systematic Phenotyping in the Mouse. Curret protocols in molecular biology. 29A.4.1-29A.4.23. Wiley Interscience. John Wiley & Sons.IncMaa- ja metsätalousministeriön asetus nro 36/EEO/2006
40. Transgeenihiiret, viitattu 12.5.2013  
[www.medicine.virginia.edu/research/cores/transgenic/all-mice-considered/ears-page](http://www.medicine.virginia.edu/research/cores/transgenic/all-mice-considered/ears-page)
41. Koe-eläinkeskus. KEK. 2013. Turun yliopisto. viitattu: 18.5.2013

## Esimerkkilasku oikeanpuoleiselle maitorauhaselle:

Hajotuspuskurin määrä: 500ul

Näytteen pipetointimäärä: 20ul

Proteiinilaimennos: 10x

Tausta, keskiarvo: 37

Proteiinin konsentraatio, laitteesta: 421,88 ug/ml

CPU (counts per unit) = 315

Korjattu CPU määrä:  $315 - 37$  (tausta) = 278 CPU /20 ul näyte

Millilitraa kohden:  $278 \text{ CPU} \cdot 50 = 13900 \text{ CPU/ml}$

**Proteiinin määrä (FB5-1, SHAM1):**  $421,88 \text{ ug/ml} \cdot 10$  (laimennos)/1000 = 4,2 mg/ml

→  $(13900 \text{ CPU/ml})/(4,2\text{mg/ml}) = \mathbf{3295 \text{ CPU/mg}}$

# Perna

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	02.11.2011	02.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Spleen
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			400 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

30	31	29	29	30	31
26	30	21	24	24	25

## Average background

28

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	1843	1816	90775	2145,039	21,5	4232
FB5-2	2	F	SHAM-2	1569	1542	77075	2069,396	20,7	3725
FB5-3	3	F	SHAM-3	1648	1621	81025	1724,023	17,2	4700
								Average	4219
								Median	4232
								SD	488

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	1416	1389	69425	2330,749	23,3	2979
FB5-5	5	F	OVX-2	1419	1392	69575	1412,659	14,1	4925
FB5-6	6	F	OVX-3	2118	2091	104525	2721,344	27,2	3841
FB5-7	7	F	OVX-4	1644	1617	80825	2359,009	23,6	3426
								Average	3793
								Median	3634
								SD	833

# Virtsarakko

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	02.11.2011	02.11.2011	21.11.2011
Study	FB5		
Sample type:	Bladder		
Dilution for protein	10 x		
Volume of lysis buffer for homogenizations	400 uL		
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		
			20 uL

## Background CPU

30	31	29	29	30	31
26	30	21	24	24	25
Average background			28		

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	3630	3603	180125	113,892	1,1	158154
FB5-2	2	F	SHAM-2	4042	4015	200725	185,089	1,9	108448
FB5-3	3	F	SHAM-3	2868	2841	142025	70,532	0,7	201363
Average									155988
Median									158154
SD									46495

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	2374	2347	117325	95,972	1,0	122249
FB5-5	5	F	OVX-2	2404	2377	118825	73,120	0,7	162507
FB5-6	6	F	OVX-3	3373	3346	167275	95,947	1,0	174341
FB5-7	7	F	OVX-4	2512	2485	124225	83,032	0,8	149611
Average									152177
Median									156059
SD									22362

# Paksusuoli

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	09.11.2011	09.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Colon
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			400 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

59	55	55	53	53	49
48	51	54	46	52	50

Average background

52

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	1334	1282	64096	285,934	2,9	22416
FB5-2	2	F	SHAM-2	620	568	28396	292,786	2,9	9698
FB5-3	3	F	SHAM-3	859	807	40346	432,709	4,3	9324
Average									13813
Median									9698
SD									7453

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	694	642	32096	406,952	4,1	7887
FB5-5	5	F	OVX-2	477	425	21246	335,724	3,4	6328
FB5-6	6	F	OVX-3	1317	1265	63246	302,658	3,0	20897
FB5-7	7	F	OVX-4	1137	1085	54246	430,939	4,3	12588
Average									11925
Median									10237
SD									6546

# Kohtu

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	09.11.2011	09.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Uterus
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			400 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

30	31	29	29	30	31
26	30	21	24	24	25

Average background

28

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	4429	4402	220075	834,076	8,3	26385
FB5-2	2	F	SHAM-2	244	217	10825	1274,292	12,7	849
FB5-3	3	F	SHAM-3	184	157	7825	1234,619	12,3	634
Average									9290
Median									849
SD									14806

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	56	29	1425	167,023	1,7	853
FB5-5	5	F	OVX-2	60	33	1625	145,920	1,5	1114
FB5-6	6	F	OVX-3	84	57	2825	211,731	2,1	1334
FB5-7	7	F	OVX-4	60	33	1625	163,162	1,6	996
Average									1074
Median									1055
SD									203

# Maitorauhanen, vasenpuoleinen

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	14.11.2011	14.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Mammary glands, left
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			500 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

45	39	41	40	36	35
38	32	35	33	34	36

## Average background

37

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	419	382	19100	347,748	3,5	5492
FB5-2	2	F	SHAM-2	318	281	14050	478,973	4,8	2933
FB5-3	3	F	SHAM-3	279	242	12100	430,145	4,3	2813
Average									3746
Median									2933
SD									1513

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	1035	998	49900	750,885	7,5	6645
FB5-5	5	F	OVX-2	385	348	17400	478,516	4,8	3636
FB5-6	6	F	OVX-3	714	677	33850	627,686	6,3	5393
FB5-7	7	F	OVX-4	652	615	30750	626,129	6,3	4911
Average									5146
Median									5152
SD									1244



# Maitorauhanen, oikeanpuoleinen

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	14.11.2011	14.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Mammary glands, right
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			500 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

45	39	41	40	36	35
38	32	35	33	34	36

## Average background

37

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	315	278	13900	421,844	4,2	3295
FB5-2	2	F	SHAM-2	244	207	10350	488,281	4,9	2120
FB5-3	3	F	SHAM-3	239	202	10100	473,175	4,7	2135
Average									2516
Median									2135
SD									674

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	843	806	40300	525,970	5,3	7662
FB5-5	5	F	OVX-2	336	299	14950	506,653	5,1	2951
FB5-6	6	F	OVX-3	427	390	19500	577,209	5,8	3378
FB5-7	7	F	OVX-4	402	365	18250	576,294	5,8	3167
Average									4289
Median									3273
SD									2255

# Ruskea rasva

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	14.11.2011	14.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Brown fat
Dilution for protein			<u>10</u> x
Volume of lysis buffer for homogenizations			<u>500</u> uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	<u>20</u> uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

54	50	44	45	45	40
40	41	37	41	42	45

## Average background

44

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	181	137	6867	1713,623	17,1	401
FB5-2	2	F	SHAM-2	190	146	7317	1419,617	14,2	515
FB5-3	3	F	SHAM-3	136	92	4617	1267,273	12,7	364
								<b>Average</b>	<b>427</b>
								<b>Median</b>	<b>401</b>
								<b>SD</b>	<b>79</b>

## Raw dil. protein

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	158	114	5717	1341,248	13,4	426
FB5-5	5	F	OVX-2	156	112	5617	1290,833	12,9	435
FB5-6	6	F	OVX-3	121	77	3867	1027,340	10,3	376
FB5-7	7	F	OVX-4	118	74	3717	1027,344	10,3	362
								<b>Average</b>	<b>400</b>
								<b>Median</b>	<b>401</b>
								<b>SD</b>	<b>36</b>

# Gonadaalinen rasva

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	14.11.2011	14.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Gonadal fat
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			700 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

## Background CPU

54	50	44	45	45	40
40	41	37	41	42	45

Average background

44

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	370	326	16317	697,601	7,0	2339
FB5-2	2	F	SHAM-2	216	172	8617	447,876	4,5	1924
FB5-3	3	F	SHAM-3	301	257	12867	635,834	6,4	2024
								Average	2095
								Median	2024
								SD	217

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	663	619	30967	1194,641	11,9	2592
FB5-5	5	F	OVX-2	628	584	29217	1059,479	10,6	2758
FB5-6	6	F	OVX-3	1330	1286	64317	1575,073	15,8	4083
FB5-7	7	F	OVX-4	505	461	23067	750,671	7,5	3073
								Average	3126
								Median	2915
								SD	668

# Aivot

## Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Brain
Dilution for protein			20 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			1000 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrificiation date	14.10.2011		

## Background CPU

39	36	36	35	33	33
30	32	30	31	32	29

## Average background

33

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	1268	1235	61750	1183,289	23,7	2609
FB5-2	2	F	SHAM-2	1455	1422	71100	1185,699	23,7	2998
FB5-3	3	F	SHAM-3	1163	1130	56500	1374,817	27,5	2055
Average									2554
Median									2609
SD									474

Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	851	818	40900	1064,850	21,3	1920
FB5-5	5	F	OVX-2	810	777	38850	1052,216	21,0	1846
FB5-6	6	F	OVX-3	1590	1557	77850	1206,177	24,1	3227
FB5-7	7	F	OVX-4	882	849	42450	1222,473	24,4	1736
Average									2182
Median									1883
SD									701

Maksa

Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Liver
Dilution for protein			150 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			500 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

Background CPU						
39	36	36	35	33	33	
30	32	30	31	32	29	
Average background			33			

Raw dil. protein									
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	38	5	250	628,845	94,3	3
FB5-2	2	F	SHAM-2	36	3	150	642,334	96,4	2
FB5-3	3	F	SHAM-3	37	4	200	1008,362	151,3	1
Average									2
Median									2
SD									1

Raw dil. protein									
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	25	-8	-400	726,318	108,9	-4
FB5-5	5	F	OVX-2	28	-5	-250	912,354	136,9	-2
FB5-6	6	F	OVX-3	35	2	100	822,205	123,3	1
FB5-7	7	F	OVX-4	27	-6	-300	727,295	109,1	-3
Average									-2
Median									-2
SD									2

Reisiluu

Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Femur
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			500 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

Background CPU					
39	36	36	35	33	33
30	32	30	31	32	29
Average background			33		

Raw dil. protein									
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	258	225	11250	484,894	4,8	2320
FB5-2	2	F	SHAM-2	321	288	14400	523,773	5,2	2749
FB5-3	3	F	SHAM-3	340	307	15350	571,259	5,7	2687
Average									2585
Median									2687
SD									232

Raw dil. protein									
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	236	203	10150	480,591	4,8	2112
FB5-5	5	F	OVX-2	278	245	12250	464,355	4,6	2638
FB5-6	6	F	OVX-3	303	270	13500	449,158	4,5	3006
FB5-7	7	F	OVX-4	242	209	10450	435,699	4,4	2398
Average									2539
Median									2518
SD									378

Suoliliepeen rasva

Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Mesenteric fat
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			500 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

Background CPU					
39	36	36	35	33	33
30	32	30	31	32	29
Average background			33		

								Raw dil. protein	
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	812	779	38950	509,735	5,1	7641
FB5-2	2	F	SHAM-2	571	538	26900	720,520	7,2	3733
FB5-3	3	F	SHAM-3	595	562	28100	667,236	6,7	4211
								Average	5195
								Median	4211
								SD	2132

								Raw dil. protein	
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	344	311	15550	984,711	9,8	1579
FB5-5	5	F	OVX-2	384	351	17550	651,764	6,5	2693
FB5-6	6	F	OVX-3	998	965	48250	822,510	8,2	5866
FB5-7	7	F	OVX-4	676	643	32150	1019,012	10,2	3155
								Average	3323
								Median	2924
								SD	1820

Retroperitoneaalinen rasva

Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Retroperitoneal fat
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			500 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

Background CPU					
39	36	36	35	33	33
30	32	30	31	32	29
Average background			33		

Raw dil. protein									
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	813	780	39000	899,139	9,0	4337
FB5-2	2	F	SHAM-2	258	225	11250	354,187	3,5	3176
FB5-3	3	F	SHAM-3	329	296	14800	508,942	5,1	2908
Average									3474
Median									3176
SD									760

Raw dil. protein									
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	592	559	27950	978,821	9,8	2855
FB5-5	5	F	OVX-2	574	541	27050	851,837	8,5	3175
FB5-6	6	F	OVX-3	1740	1707	85350	1690,125	16,9	5050
FB5-7	7	F	OVX-4	598	565	28250	941,437	9,4	3001
Average									3520
Median									3088
SD									1028



Emätin

Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study			FB5
Sample type:			Vagina
Dilution for protein			10 x
Volume of lysis buffer for homogenizations			400 uL
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	20 uL
OVX date	10.08.2011		
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

Background CPU					
39	36	36	35	33	33
30	32	30	31	32	29
Average background			33		

								Raw dil. protein	
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	726	693	34650	157,990	1,6	21932
FB5-2	2	F	SHAM-2	457	424	21200	269,897	2,7	7855
FB5-3	3	F	SHAM-3	316	283	14150	212,006	2,1	6674
								Average	12154
								Median	7855
								SD	8489

								Raw dil. protein	
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-4	4	F	OVX-1	85	52	2600	104,712	1,0	2483
FB5-5	5	F	OVX-2	141	108	5400	78,333	0,8	6894
FB5-6	6	F	OVX-3	150	117	5850	74,512	0,7	7851
FB5-7	7	F	OVX-4	72	39	1950	65,344	0,7	2984
								Average	5053
								Median	4939
								SD	2714

Munasarjat

Tissue Luciferase

	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date	17.11.2011	17.11.2011	21.11.2011
Study	FB5		
Sample type:	Ovaries		
Dilution for protein	10 x		
Volume of lysis buffer for homogenizations	400 uL		
Date of birth	14.06.2011	Sample volume for CPU counts	
OVX date	10.08.2011	20 uL	
High fat diet date	18.08.2011		
Sacrification date	14.10.2011		

Background CPU					
39	36	36	35	33	33
30	32	30	31	32	29
Average background			33		

								Raw dil. protein	
Animal	Lysis code	Gender	Group code	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein
FB5-1	1	F	SHAM-1	2922	2889	144450	209,290	2,1	69019
FB5-2	2	F	SHAM-2	1518	1485	74250	191,528	1,9	38767
FB5-3	3	F	SHAM-3	5495	5462	273100	190,735	1,9	143183
								Average	83656
								Median	69019
								SD	53725

Jatkotutkimus, pelleteoitu ja käsittelemätön

Maitorauhanen no.4, 1 pvä

Tissue Luciferase													
MG 4 placebo pelleted vs intact				Homogenized	Luc assay		Protein assay						
Date				19.12.2011	22.12.2011		22.12.2011						
Study				hAro-Luc supportive data									
Sample type:				Mammary gland #4									
Dilution for protein				20									
Vol. For homogenization				500	Sample vol for CPU counts		20						
Date of sacrifice				14.12.2011									
1 Day; MG placebo pelleted													
										Raw protein			
										Corrected			
DoB	Age (d)	Age mo	Animal	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	rel. CPU/mg protein
12.06.2011	185	~ 6 mo	P1 / 2588	P1 MG4R	F	intact	661	618	30879	827,271	16,5	1866	166,8
03.07.2011	164	~ 5 mo	P2/ 2656	P2 MG4R	F	intact	140	97	4829	640,167	12,8	377	33,7
29.07.2011	138	~ 4,5 mo	P5/ 2697	P5 MG4R	F	intact	429	386	19279	654,388	13,1	1473	131,6
31.07.2011	136	~ 4,5 mo	P9/ 2705	P9 MG4R	F	intact	361	318	15879	1045,471	20,9	759	67,9
											Average	1119	100
											SD	674	60,2
1 Day; MG intact													
										Raw protein			
										Corrected			
DoB	Age (d)	Age mo	Animal	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	rel. CPU/mg protein
12.06.2011	185	~ 6 mo	P1 / 2588	P1 MG4L	F	intact	141	98	4879	453,125	9,1	538	48,1
03.07.2011	164	~ 5 mo	P2/ 2656	P2 MG4L	F	intact	481	438	21879	1037,964	20,8	1054	94,2
29.07.2011	138	~ 4,5 mo	P5/ 2697	P5 MG4L	F	intact	185	142	7079	393,799	7,9	899	80,3
31.07.2011	136	~ 4,5 mo	P9/ 2705	P9 MG4L	F	intact	120	77	3829	468,353	9,4	409	36,5
											Average	725	65
											SD	302	27

# Jatkotutkimus, pelleteitu ja käsittelemätön

## Maitorauhanen no.4, 1 pvä

### Korjattu

#### Tissue Luciferase

MG 4	placebo pelleted vs intact	Homogenized	Luc assay	Protein assay
Date		19.12.2011	22.12.2011	22.12.2011
Study		hAro-Luc supportive data		
Sample type:		Mammary gland #4		
Dilution for protein		20		
Vol. For homogenization		20		
Date of sacrifice	14.12.2011	500 Sample vol for CPU counts		
1 Day; MG placebo pelleted				

#### Background CPU

52	52	49	44	45	47
40	39	40	39	37	37

Average background

43

#### Raw protein

DoB	Age (d)	Age mo	Animal	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	PU/mg protei.	CPU/mg protein
12.06.2011	185	~ 6 mo	P1 / 2588	P1 MG4R	F	intact	661	618	30879	827,271	16,5	1866	144,9
03.07.2011	164	~ 5 mo	P2/ 2656	P2 MG4R	F	intact	481	438	21879	1037,964	20,8	1054	81,8
29.07.2011	138	~ 4,5 mo	P5/ 2697	P5 MG4R	F	intact	429	386	19279	654,388	13,1	1473	114,4
31.07.2011	136	~ 4,5 mo	P9/ 2705	P9 MG4R	F	intact	361	318	15879	1045,471	20,9	759	59,0

Average

1288

100

SD

484

37,6

#### Raw protein

DoB	Age (d)	Age mo	Animal	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	PU/mg protei.	CPU/mg protein
12.06.2011	185	~ 6 mo	P1 / 2588	P1 MG4L	F	intact	141	98	4879	453,125	9,1	538	41,8
03.07.2011	164	~ 5 mo	P2/ 2656	P2 MG4L	F	intact	140	97	4829	640,167	12,8	377	29,3
29.07.2011	138	~ 4,5 mo	P5/ 2697	P5 MG4L	F	intact	185	142	7079	393,799	7,9	899	69,8
31.07.2011	136	~ 4,5 mo	P9/ 2705	P9 MG4L	F	intact	120	77	3829	468,353	9,4	409	31,7

Average

556

43

SD

239

19

Jatkotutkimus, pelleteoitu ja käsittelemätön

Maitorauhanen no.4, 6 pvä

Tissue Luciferase

MG 4 placebo pelleted vs intact

	Homogeni:	Luc assay	Protein assay						
Date	19.12.2011	22.12.2011	22.12.2011	Background CPU					
Study	hAro-Luc supportive data			52	52	49	44	45	47
Sample type:	Mammary gland #4			40	39	40	39	37	37
Dilution for protein	20 x			Average background			43		
Vol. For homogenization	500	Sample vol for CPU co	20 uL						

6 Day; MG placebo pelleted

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	Raw protein ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
07.07.2011	16.12.2011	162	~ 5 mo	P3/ 2680	P3 MG4R	F	intact	2572	2529	126429	821,594	16,4	7694	93,3
07.07.2011	16.12.2011	162	~ 5 mo	P4/ 2683	P4 MG4R	F	intact	4710	4667	233329	1106,201	22,1	10546	127,9
29.07.2011	16.12.2011	140	~ 4,5 mo	P6/ 2700	P6 MG4R	F	intact	1967	1924	96179	891,602	17,8	5394	65,4
29.07.2011	16.12.2011	140	~ 4,5 mo	P7/ 2701	P7 MG4R	F	intact	1524	1481	74029	743,591	14,9	4978	60,3
29.07.2011	16.12.2011	140	~ 4,5 mo	P8/2698	P8 MG4R	F	intact	4487	4444	222179	879,456	17,6	12632	153,1
												Average	8249	100
												SD	3303	40,0

6 Day; MG intact

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	Raw protein ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
07.07.2011	16.12.2011	162	~ 5 mo	P3/ 2680	P3 MG4L	F	intact	277	234	11679	552,094	11,0	1058	59,5
07.07.2011	16.12.2011	162	~ 5 mo	P4/ 2683	P4 MG4L	F	intact	568	525	26229	580,78	11,6	2258	127,0
29.07.2011	16.12.2011	140	~ 4,5 mo	P6/ 2700	P6 MG4L	F	intact	499	456	22779	447,845	9,0	2543	143,1
29.07.2011	16.12.2011	140	~ 4,5 mo	P7/ 2701	P7 MG4L	F	intact	317	274	13679	475,769	9,5	1438	80,9
29.07.2011	16.12.2011	140	~ 4,5 mo	P8/2698	P8 MG4L	F	intact	367	324	16179	508,087	10,2	1592	89,6
												Average	1778	100
												SD	609	34

# Jatkotutkimus, eri-ikäiset ja eri maitorauhaset

## Maitorauhanen no.4, oikeanpuoleinen

### Tissue Luciferase

MG 4

Date	HomogenizedLuc assay		Protein assay		Background CPU		
	19.12.2011	22.12.2011	22.12.2011		52	52	49
Study	hAro-Luc supportive data				40	39	40
Sample type:	Mammary gland #4				Average background		
Dilution for protein				20	43		
Vol. For homogenization	500 Sample vol for CPU counts			20 uL			

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal DNA	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	Raw protein ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
26.05.2011	14.12.2011	202	~ 6,5 mo	2575	2575 MG4R	F	intact	288	245	12229	632,568	12,7	967	32,4
07.06.2011	14.12.2011	190	~ 6 mo	2584	2584 MG4R	F	intact	270	227	11329	517,303	10,3	1095	36,7
07.06.2011	14.12.2011	190	~ 6 mo	2585	2585 MG4R	F	intact	2490	2447	122329	718,719	14,4	8510	285,4
07.06.2011	14.12.2011	190	~ 6 mo	2586	2586 MG4R	F	intact	323	280	13979	515,747	10,3	1355	45,5

Average	2982	100
SD	3689	123,7

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal DNA	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	Raw protein ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
20.07.2011	14.12.2011	147	~5 mo	2687	2687 MG4R	F	intact	284	241	12029	553,711	11,1	1086	43,2
20.07.2011	14.12.2011	147	~5 mo	2689	2689 MG4R	F	intact	365	322	16079	606,201	12,1	1326	52,8
26.07.2011	14.12.2011	141	~5 mo	2693	2693 MG4R	F	intact	1754	1711	85529	814,758	16,3	5249	208,9
26.07.2011	14.12.2011	141	~ 5 mo	2694	2694 MG4R	F	intact	1261	1218	60879	781,83	15,6	3893	155,0
26.07.2011	14.12.2011	141	~ 5 mo	2696	2696 MG4R	F	intact	270	227	11329	562,439	11,2	1007	40,1

Average	2512	100
SD	1943	77

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal DNA	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
23.08.2011	14.12.2011	113	~4 mo	2741	2741 MG4R	F	intact	259	216	10779	490,204	9,8	1099	74,2
23.08.2011	14.12.2011	113	~4 mo	2744	2744 MG4R	F	intact	256	213	10629	380,005	7,6	1399	94,3
23.08.2011	14.12.2011	113	~4 mo	2749	2749 MG4R	F	intact	330	287	14329	531,311	10,6	1348	90,9
23.08.2011	14.12.2011	113	~ 4 mo	2750	2750 MG4R	F	intact	370	327	16329	432,617	8,7	1887	127,3
23.08.2011	14.12.2011	113	~ 4 mo	2751	2751 MG4R	F	intact	357	314	15679	466,705	9,3	1680	113,3

Average	1483	100
SD	306	21

# Jatkotutkimus, eri-ikäiset ja eri maitorauhaset

## Maitorauhanen no.2, oikeanpuoleinen

Tissue Luciferase

MG 2

Date	Homogenized		Luc assay	Protein assay		Background CPU	
	19.12.2011	22.12.2011	22.12.2011	19.12.2011	22.12.2011		
Study	hAro-Luc supportive data					52	52
Sample type:	Mammary gland #2					49	44
Dilution for protein	20 x					45	47
Vol. For homogenization	500 Sample vol for CPU counts					40	39
	20 uL					40	39
						Average background	
						43	

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal DNA	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
26.05.2011	14.12.2011	202	~ 6,5 mo	2575	2575 MG2R	F	intact	282	239	11929	717,163	14,3	832	67,1
07.06.2011	14.12.2011	190	~ 6 mo	2584	2584 MG2R	F	intact	328	285	14229	667,755	13,4	1065	86,0
07.06.2011	14.12.2011	190	~ 6 mo	2585	2585 MG2R	F	intact	504	461	23029	691,711	13,8	1665	134,3
07.06.2011	14.12.2011	190	~ 6 mo	2586	2586 MG2R	F	intact	372	329	16429	588,196	11,8	1397	112,7

												Average	1240	100
												SD	366	29,5

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal DNA	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	Raw protein ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
20.07.2011	14.12.2011	147	~5 mo	2687	2687 MG2R	F	intact	275	232	11579	683,838	13,7	847	40,7
20.07.2011	14.12.2011	147	~5 mo	2689	2689 MG2R	F	intact	479	436	21779	836,67	16,7	1302	62,5
26.07.2011	14.12.2011	141	~5 mo	2693	2693 MG2R	F	intact	1355	1312	65579	893,127	17,9	3671	176,4
26.07.2011	14.12.2011	141	~ 5 mo	2694	2694 MG2R	F	intact	1927	1884	94179	1250,122	25,0	3767	181,0
26.07.2011	14.12.2011	141	~ 5 mo	2696	2696 MG2R	F	intact	326	283	14129	863,953	17,3	818	39,3

												Average	2081	100
												SD	1508	72

DoB	Sacr	Age (d)	Age mo	Animal DNA	Lysis code	Gender	Gonadal status	Raw CPU	Corrected CPU/20 uL	CPU/ml	ug/ml	Protein mg/ml	CPU/mg protein	Rel. CPU/mg protein
23.08.2011	14.12.2011	113	~4 mo	2741	2741 MG2R	F	intact	312	269	13429	981,995	19,6	684	46,0
23.08.2011	14.12.2011	113	~4 mo	2744	2744 MG2R	F	intact	1130	1087	54329	862,701	17,3	3149	211,8
23.08.2011	14.12.2011	113	~4 mo	2749	2749 MG2R	F	intact	364	321	16029	729,248	14,6	1099	73,9
23.08.2011	14.12.2011	113	~ 4 mo	2750	2750 MG2R	F	intact	370	327	16329	600,25	12,0	1360	91,5
23.08.2011	14.12.2011	113	~ 4 mo	2751	2751 MG2R	F	intact	346	303	15129	663,452	13,3	1140	76,7

												Average	1486	100
												SD	961	65

Tuesday 9.00 am. Anou

02.02.2011

**Luciferase activity measurement from tissues****Tissue preparation:**

Prepare lysis buffer (100 ml) when needed:

- 1.25 ml 50x TAE pH 8.0 *→ Tris has 0,4% of the acid & EDTA*
  - 200 µl 0,5 M EDTA pH 8.0
  - 11,36 ml glycerol (88-86%)\*
  - 1 ml Triton-X-100 *show*
- add dist. water up to 100 ml (86,19 ml).

*\*Note, when glycerol ≥99% is used add 10 ml.**→ This basic mix can be stored at +4°C.*

Just before use add following components into each 20 ml of lysis buffer:

- 40 µl 1M DTT (DL-Dithiothreitol, prepared in PBS, aliquoted, and stored at -20°C)
  - 1 complete minitab (Roche)
- dissolve on ice (takes some time)

**Tissue homogenization**

Prepare coded plastic tubes for each sample to be homogenized, i.e. one ~13 ml round bottom disposable plastic tube for homogenization and 2 x eppendorf tubes for each homogenate (one tube for collection of homogenate for centrifugation, and one tube for supernatant). Ice and dry ice are needed for sample storage during homogenization.

Store tissue samples on dry ice. Transfer frozen tissue sample into ~13 ml tube, add lysis buffer at appropriate volume (usually 400-1000 µl/sample) and homogenize with Ultra-turrax (22000-24000 1/min). *4-5 min*

Wash blade between samples with 3 x dist. water followed with 1 x lysis buffer. Change wash solutions when needed. Store homogenates on ice. Centrifuge samples at +4°C with eppendorf centrifuge (fits 24 samples at the time) for 30 min. Collect supernatant to new clearly coded eppendorf tubes. Measure luciferase activity immediately or store samples at -80°C max. 7 days prior to activity measurements.

*Protein needed*

*Note: Save some lysis buffer for background measurements in CPU analysis and for preparation of standards in protein analysis.*

**Luciferase activity measurement with Luciferase assay kit (BioThema)**

1. Take one vial of D-luciferin (yellow cap) and one vial of ATP (blue cap) and reconstitution buffer to room temperature and prepare the solutions ready one hour before measurement.
2. Reconstitute the lyophilized reagents by adding 10 ml of buffer to D-luciferin and 12 ml to ATP vial.
3. Pipet samples into clean 96-well plate (LumiTract 200), 20 µl per well (one well for each sample).

When pipeting the samples keep the plate on ice.

*Note 1: first line of each plate is used for background measurement. Instead of samples, pipet lysis buffer in these wells.*

*Note 2: Samples with expected very high CPU counts (raw CPU counts >5000) should be positioned last in plate to avoid interference with lower count results.*

*has 4 oxidativ enzymes used in bio  
luciferase enzyme by firefly luciferase  
color varies b/w yellowgreen to red  
→ also a reporter the activity of any  
regulatory elements that control its expression  
- useful in human cells organisms  
\* luciferase provide window into mechanisms  
that regulate activity of specific genes in specific  
living cells*





02.02.2011

Luc analysis plate map

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B	sample 1	sample 2	sample 3	sample 4	sample 5	sample 6	sample 7	sample 8	sample 9	sample 10	sample 11	sample 12
C	sample 13	sample 14	sample 15	sample 16	sample 17	sample 18	sample 19	sample 20	sample 21	sample 22	sample 23	sample 24
D	sample 25	sample 26	sample 27	sample 28	sample 29	sample 30	sample 31	sample 32	sample 33	sample 34	sample 35	sample 36
E	sample 37	sample 38	sample 39	sample 40	sample 41	sample 42	sample 43	sample 44	sample 45	sample 46	sample 47	sample 48
F	sample 49	sample 50	sample 51	sample 52	sample 53	sample 54	sample 55	sample 56	sample 57	sample 58	sample 59	sample 60
G	sample 61	sample 62	sample 63	sample 64	sample 65	sample 66	sample 67	sample 68	sample 69	sample 70	sample 71	sample 72
H	sample 73	sample 74	sample 75	sample 76	sample 77	sample 78	sample 79	sample 80	sample 81	sample 82	sample 83	sample 84

4. Add 100  $\mu$ L of reconstituted D-luciferin per well with multichannel pipet (if applicable). Do not touch well edges and avoid bubbles. Cover with foil and let shake gently for a couple of minutes while starting up Victor. Store the remaining reagents labeled with date in  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Note: The reconstituted reagents are stable for 1 month at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Don't use ATP substrate from one kit lot with luciferin substrate from another kit lot.*

5. Victor<sup>3</sup> Multilabel Counter at Dept. of Physiology is used for the assays (need to be reserved). Open Victor and select using "UTU163" measurement protocol. Select dispenser maintenance and flush dispenser with dist water, empty dispenser, and place the tube in ATP solution. Fill dispenser with ATP solution. Make sure the tube reaches at the bottom of the ATP solution vial.
6. Place the 96-well plate without the foil in the plate holder and start program "UTU163" by using "wizard". Select the wells you want to measure (as "measured"). Analysis of one full plate takes approx. 30 min.
7. Remove the plate. Select dispenser maintenance and empty the ATP solution from the tubes into ATP vial. Place the tubes into dist. water and flush. Leave tube to dist. water.

*Note: The analyzed plates are left in hood next to Victor equipment to dry out. Dried plates are discarded with solid waste.*

### 50 x TAE buffer, pH 8,0

For 100 ml

- TRIS 24,2 g
- 10 ml 0.5 M EDTA
- 5,71 ml Acetic acid
- dist. water up to 100 ml\*.

⇒ \*Check pH prior filling up to total volume and adjust with acetic acid if needed.

### 0,5 M EDTA, pH 8.0

55,83 g EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )  
add 200 ml dist.  $\text{H}_2\text{O}$

Adjust pH to 8.0 with 10 N NaOH. EDTA is difficult to dissolve; NaOH should be added enough (about 15 ml) to get EDTA dissolved (takes time!). pH can be adjusted to 8,0 after dissolving EDTA completely. Add dist.  $\text{H}_2\text{O}$  up to 300 ml.

## Protein analysis of tissue homogenates/ BCA kit (Pierce)

- Tissue homogenate samples need to be diluted for protein analysis depending on the expected protein content. Usually, 10–50 x dilution into PBS is used.
- Thaw frozen samples on ice. Prepare dilutions and keep the diluted samples on ice.
- 100 mg of BSA (bovine serum albumin) in PBS is used as reference. Stock can be stored aliquoted in -20°C.
- Use round bottom clear 96-well plates for analysis

Prepare following standards (serial dilution) into appropriate solution (content of lysis buffer in PBS similar, 1/1) in final diluted samples to be analyzed).

- 2 mg/ml = 20 µl of stock (100 mg/ml BSA) + 980 µl PBS+lysis buffer
- 1,5 mg/ml = 750 µl of dilution 1 + 250 µl PBS+lysis buffer
- 1 mg/ml = 667 µl of dilution 2 + 333 µl PBS+lysis buffer
- 750 µg/ml = 750 µl of dilution 3 + 250 µl PBS+lysis buffer
- 500 µg/ml = 667 µl of dilution 4 + 333 µl PBS+lysis buffer
- 250 µg/ml = 500 µl of dilution 5 + 500 µl PBS+lysis buffer
- 125 µg/ml = 500 µl of dilution 6 + 500 µl PBS+lysis buffer
- 25 µg/ml = 200 µl of dilution 7 + 800 µl PBS+lysis buffer

1x PBS pH 7.4  
1:50  
10 ml 9,8 mL PBS  
200 µl LB

- Prepare needed volume of working reagent (WR) by using A and B solutions in ratio of 50:1 (A:B). The solutions A and B are provided in BCA kit.

Note: excess of WR solution is absorbed into paper towels and discarded.

- Pipette 25 µl of each standard or unknown sample replicates into a microplate well.
- The order of samples in plate is as follows:

1:50  
98 µl PBS  
2 µl homogenate = 50x dilution

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	STD 8	STD 8	STD 7	STD 7	STD 6	STD 6	STD 5	STD 5	STD 4	STD 4
B	STD 3	STD 3	STD 2	STD 2	STD 1	STD 1	Unk 1	Unk 1	Unk 2	Unk 2	Unk 3	Unk 3
C	Unk 4	Unk 4	Unk 5	Unk 5	Unk 6	Unk 6	Unk 7	Unk 7	Unk 8	Unk 8	Unk 9	Unk 9
D	Unk 10	Unk 10	Unk 11	Unk 11	Unk 12	Unk 12	Unk 13	Unk 13	Unk 14	Unk 14	Unk 15	Unk 15
E	Unk 16	Unk 16	Unk 17	Unk 17	Unk 18	Unk 18	Unk 19	Unk 19	Unk 20	Unk 20	Unk 21	Unk 21
F	Unk 22	Unk 22	Unk 23	Unk 23	Unk 24	Unk 24	Unk 25	Unk 25	Unk 26	Unk 26	Unk 27	Unk 27
G	Unk 28	Unk 28	Unk 29	Unk 29	Unk 30	Unk 30	Unk 31	Unk 31	Unk 32	Unk 32	Unk 33	Unk 33
H	Unk 34	Unk 34	Unk 35	Unk 35	Unk 36	Unk 36	Unk 37	Unk 37	Unk 38	Unk 38	Unk 39	Unk 39

- Add 200 µl of the WR to each well and mix plate thoroughly on plate shaker for 30 sec.
- Cover plate with parafilm and incubate at +37°C for 30 min.
- Cool plate to RT
- Open Multicalc on Victor<sup>2</sup> and go to "E protocol edit". Select from the list program "99 BCA2" and enter this program. Scroll down the program parameters and at the end wait until "Quit and Save" appears as option for functions. Quit and Save and leave the Multicalc open.
- Open Victor<sup>2</sup> and select "BCA2" program. Start Wizard and create the plate map you want to analyze (STDs and blanks are ready programmed. Select the sample wells to be measured).
- Continue to start the program.

Note: The program will give an error notice if wrong filter wheel is installed. If this happens, change the wheel and start BCA2 wizard again.

Note: The analyzed plates are left in hood next to Victor equipment to dry out. Dried plates are discarded with solid waste.

K TARJA for HELP!! This have to be modified specially for you.

SEQ	WELL	CODE	ABSORB	CONC	UNIT	%CV
1	A01	BLANK	0.408			
2	A02	BLANK	0.384			
AVG.		BLANK	0.396		ug/ml	4.3
3	A03	STD	0.405	25.000		
4	A04	STD	0.425	25.000		
AVG.		STD	0.415	25.000	ug/ml	3.4
5	A05	STD	0.524	125.000		
6	A06	STD	0.534	125.000		
AVG.		STD	0.529	125.000	ug/ml	1.3
7	A07	STD	0.652	250.000		
8	A08	STD	0.657	250.000		
AVG.		STD	0.655	250.000	ug/ml	0.5
9	A09	STD	1.002	500.000		
10	A10	STD	0.949	500.000		
AVG.		STD	0.975	500.000	ug/ml	3.8
11	A11	STD	1.230	750.000		
12	A12	STD	1.245	750.000		
AVG.		STD	1.237	750.000	ug/ml	0.9
13	B01	STD	1.416	1000.000		
14	B02	STD	1.369	1000.000		
AVG.		STD	1.392	1000.000	ug/ml	2.4
15	B03	STD	1.755	1500.000		
16	B04	STD	1.717	1500.000		
AVG.		STD	1.736	1500.000	ug/ml	1.5
17	B05	STD	2.987	2000.000		
18	B06	STD	2.145	2000.000		
AVG.		STD	2.071	2000.000	ug/ml	5.1

BLANK = 0.396 ( 0 )

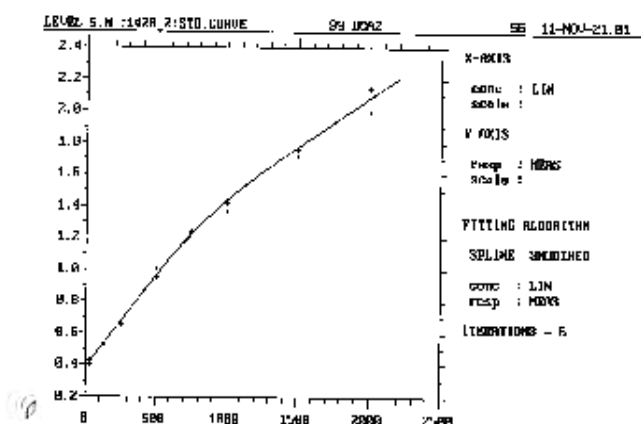
ED-20 = 312.3 ED 50 = 776.5 ED-80 = 1462

X AXIS (CONCENTRATION) = LIN SLOPE = 0.0009  
 Y-AXIS (RESPONSE) = MEAS INTERCEPT = 0.384  
 FITTING ALGORITHM = SPLINE SMOOTHED VARIANCE RATIO = 1.153

STD	CONC	CALC.CONC	%DIFF	RESPONSE	%cvRESP	%cvCONC
1.1	25.00	13.07	-47.7	0.405		
1.2	25.00	35.16	40.6	0.425		
AVG.	25.00	26.54	6.15	0.415	***** 3.41	64.8
2.1	125.0	120.5	-3.59	0.524		
2.2	125.0	129.2	3.32	0.534		
AVG.	125.0	124.8	-0.16	0.529	***** 1.34	4.90
3.1	250.0	230.6	-7.76	0.652		
3.2	250.0	234.9	-6.03	0.657		
AVG.	250.0	232.0	-6.88	0.655	***** 0.54	1.32
4.1	500.0	535.5	7.09	1.002		
4.2	500.0	467.0	-2.44	0.949		
AVG.	500.0	511.5	2.31	0.975	***** 3.84	6.59
5.1	750.0	756.0	0.81	1.230		
5.2	750.0	772.9	3.05	1.245		
AVG.	750.0	764.8	1.98	1.237	***** 0.86	1.48
6.1	1000	973.9	-2.61	1.416		
6.2	1000	915.0	-8.50	1.369		
AVG.	1000	944.1	-5.59	1.392	***** 2.39	4.41
7.1	1500	1471	-1.93	1.755		
7.2	1500	1411	-5.97	1.717		
AVG.	1500	1441	-3.96	1.736	***** 1.55	2.97

99 BCA2 11-11-21 Sivu 2

8.1	2000	1860	-6.98	1.997
8.2	2000	2090	4.97	2.145
AVG.	2000	1980	-1.01	2.071 ***** 5.05 3.54



99 BCA2 56 11-NOV-21.01

SEQ	PAT	WELL	CODE	ABSORB	CONC	UNIT	%CV
19	1	B07		0.523	119.629		
20	1	B08		0.504	103.320		
AVG.	1			0.513	111.475	ug/ml	10.3
21	2	B09		0.508	152.816		
22	2	B10		0.595	177.368		
AVG.	2			0.599	185.089	ug/ml	5.9
23	3	B11		0.452	58.447		
24	3	B12		0.480	82.617		
AVG.	3			0.466	70.532	ug/ml	24.2
25	4	C01		0.497	97.266		
26	4	C02		0.494	94.678		
AVG.	4			0.495	95.972	ug/ml	1.9
27	5	C03		0.468	72.266		
28	5	C04		0.470	73.975		
AVG.	5			0.469	73.120	ug/ml	1.7
29	6	C05		0.495	95.508		
30	6	C06		0.495	96.387		
AVG.	6			0.495	95.947	ug/ml	0.6
31	7	C07		0.480	82.617		
32	7	C08		0.481	83.447		
AVG.	7			0.480	83.032	ug/ml	0.7
33	8	C09		0.719	289.086		
34	8	C10		0.714	283.763		
AVG.	8			0.716	285.934	ug/ml	1.1
35	9	C11		0.710	280.334		
36	9	C12		0.739	305.257		
AVG.	9			0.725	292.786	ug/ml	6.0
37	10	D01		0.899	443.665		
38	10	D02		0.874	421.753		
AVG.	10			0.887	432.709	ug/ml	3.6

Assay 9601, measured on 11/14/2011 1:28:44 PM. Instrument ID: 4200635

## Protocol description

Protocol name ..... UTU163 mittaus  
 Protocol number ..... N/A  
 Name of the plate type ..... Generic 8x12 size plate  
 Number of repeats ..... 1  
 Delay between repeats ..... 0 s  
 Measurement height ..... Default  
 Protocol notes ..... 091107 EVE Testis, kidney, ovary LUC

Injector ..... 1  
 Speed ..... 4  
 Volume ..... 100 µL  
 Increment ..... 0 µL  
 Replicate ..... 1  
 Injection mode ..... aspVol=dispVol  
 Repeated operation ..... Yes

Delay duration ..... 2.0 s  
 Repeated operation ..... Yes

Kinetic repeats ..... 1  
 Kinetic delay ..... 0.0 s  
 Name of the label ..... cps LUC 10s  
 Label technology ..... Luminometry  
 Emission filter name ..... No filter (Luminescence)  
 Emission filter slot ..... A7  
 Measurement time ..... 10.0 s  
 Emission aperture ..... Normal

### Plate map of plate 1

```
A | M M M M M M M M M M M M
B | M M M M M M M M M M M M
C | M M M M M M M M M M M M
D | M M M M E E E E E E E E
E | E E E E E E E E E E E E
F | E E E E E E E E E E E E
G | E E E E E E E E E E E E
H | E E E E E E E E E E E E
```

Protocol created by ..... Victor  
 Protocol creation date ..... 11/9/2007  
 Protocol last edited by ..... Victor  
 Protocol last edited ..... 6/21/2011

Instrument serial number: ..... 4200635  
 Assay ID: ..... 9601  
 Measured on ..... 11/14/2011 1:28:44 PM

Assay 10000, measured on 11/27/2012 4:47:16 PM. Instrument ID

## Protocol description

Protocol name ..... BCA2  
 Protocol number ..... 99  
 Name of the plate type ..... Generic 8x12 size plate  
 Number of repeats ..... 1  
 Delay between repeats ..... 0 s  
 Measurement height ..... Default  
 Protocol notes .....

Name of the label ..... Abs@ 570 ( 1s )  
 Label technology ..... Photometry  
 CW-lamp filter name ..... P570  
 CW-lamp filter slot ..... B7  
 Measurement time ..... 1.0 s  
 Absorbance Mode ..... Visible  
 Excitation Aperture ..... Normal

Plate map of plate 1

A	B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
C	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK	UK
D	UK	UK	UK	UK	E	E	E	E	E	E	E	E
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
F	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
G	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
H	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E

Protocol created by ..... Victor  
 Protocol creation date ..... 4/12/2005  
 Protocol last edited by ..... Victor  
 Protocol last edited ..... 10/29/2012

Instrument serial number: ..... 4200635  
 Assay ID: ..... 10635  
 Measured on ..... 11/27/2012 4:47:16 PM

## Reagenssit

50x TAE, pH 8,0 (13.12.10/NSA)

0,5M EDTA, pH 8,0 (9.5.08 TRA)

Glyseroli, 85 % (Yliopiston apteekki, glyseroli 85 %, 1/3 -01 Risa, 60500B, käytettävä ennen 072001)

Triton x-100 (Sigma, for molecular biology)

DTT, (Dithiothreitol,  $C_4H_{10}O_2S_2$ , Sigma-Aldrich, 99 % titration, avattu 8.2–07, haitallinen, 115K0695)

BSA (Albumin from bovine serum, Sigma-Aldrich, 98% electrophoresis, 094K1225, saapunut 8.07.2005, at +2 - +8 °C)

Minitabletti (Roche, complete, Mini, 04 693 124 001, store at +2 - +8 °C)

## Liuosten valmistus

1. BSA PBS:ssa, boviiniseerumin albumiinia fosfaattipuskuroidussa salinissa  
Punnitaan 100 mg boviiniseerumin albumiinia ja liuotetaan se 1 ml:aan PBS.  
(18.1.2012) Valmistettu liuos annostellaan eppareihin noin 50 µl:n annoksina ja säilytetään pakastimessa (-20 °C).
2. DTT, dithiothreitol  
Punnitaan 0,15 g ja liuotetaan se 1 ml:aan PBS. Annostellaan eppareihin n. 45 µl:n annoksina ja säilytetään pakastimessa (-20 °C).
3. Hajotuspuskurin kantaliuos  
Valmistetaan 100 ml kantaliuosta pipetoimalla 1,25 ml 5x TAE, 200 µl 0,5 M EDTA, 11,36 ml glyserolia, 1 ml Triton x-100 ja 86,19 dH<sub>2</sub>O 100 ml:n säilöpulloon, jonka jälkeen sekoitetaan liuos varovasti.
4. Hajotuspuskurin käyttöliuos  
50 ml:n käyttöliuokseen tarvitaan 40 µl 1M DTT (dithiothreitol) ja yksi minitabletti, jotka toimivat pelkistäjinä suojaten proteiineja. Valmistettua liuosta pidetään jäissä ja ravistellaan väliajoin (noin viiden minuutin välein), jotta minitabletti liukenee ja muutkin ainekset sekoittuvat hyvin.
5. Proteiinimäärityksen standardiliuos  
Regressiosuoraa (liite 5) varten valmistetaan standardiliuokset taulukko 1:n mukaisesti.

Taulukko 1. Standardiliuosten pipetointilavuudet.

Std-liuos	Konsentraatio (µg/ml)	
1	2000	20 µl BSA:n kantaliuos + 980 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
2	1,500	750 µl std 1 + 250 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
3	1000	667 µl std 1 + 333 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
4	750	750 µl std 1 + 250 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
5	500	667 µl std 1 + 333 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
6	250	500 µl std 1 + 500 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
7	125	500 µl std 1 + 500 µl PBS-hajotuspuskuri -seos
8	25	200 µl std 1 + 800 µl PBS-hajotuspuskuri -seos